MOLEKULARGENETISCHE CHARAKTERISIERUNG DES HLA-B27 ANTIGENS: EIN BEITRAG ZUM VERSTÄNDNIS DER BIOCHEMISCHEN GRUNDLAGEN HLA-ASSOZIIERTER ERKRANKUNGEN

Hannelore Szöts

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554808_0055

MOLEKULARGENETISCHE CHARAKTERISIERUNG DES HLA-B27 ANTIGENS: EIN BEITRAG ZUM VERSTÄNDNIS DER BIOCHEMISCHEN GRUNDLAGEN HLA-ASSOZIIERTER ERKRANKUNGEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs
Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Hannelore Szöts
aus Kronstadt (Rumänien)

München, 1985

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Cleve

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Wolf

Sondergutachter: Prof. Dr. T. Meo

Tag der mündlichen Prüfung: 26.05.1986

Meinem Mann und

meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis Seite

ZUSAMMENFASSUNG 5

1. EINLEITUNG 7

1.1. Der Haupthistokompatibilitätskomplex 8

1.2. Organisation des MHC 9

1.3. MHC Klasse I 12

1.3.1. Aufbau der Gene 12

1.3.2. Struktur der Produkte 13

1.3.3. Homologie zu den Immunglobulinen 15

1.3.4. Vorkommen und Funktion der Antigene 16

1.3.5. Polymorphismus 17

1.4. HLA und Krankheit 20

1.5. HLA-B27, Ankylosierende Spondylitis und die Problemstellung dieser Arbeit 24

2. ERGEBNISSE 30

2.1. Charakterisierung des Ausgangmaterials 30

2.2. RNA Präparation von der B-Zellinie LG-2 32

2.2.1. RNA Extraktion und Anreicherung von HLA spezifischer mRNA 32

2.2.2. Analyse der RNA Präparationen 34

2.2.3. Quantifizierung der HLA Klasse I mRNA in den Präparationen 38

2.3. Herstellung der cDNA Bank 39

2.3.1. Qualität und Effizienz der cDNA Reaktionen 39

2.3.2. Homopolymeres Tailing der ds cDNA 42

2.3.3. Verpackung der cDNA, Transformation und Selektion 42

2.3.4. Transformationseffizienz 43

2.4. Identifizierung und Gruppierung der HLA Klasse I positiven cDNA Klone 45

2.4.1. Charakterisierung der verwendeten Proben 45
2.4.2. Identifizierung von HLA Klasse I positiven cDNA Klonen 48
2.5. Charakterisierung der HLA Klasse I cDNAs der LG-2 Zelle 51
2.5.1. Gruppierung in HLA-A und HLA-B Klone aufgrund von Restriktionskarten 51
2.5.2. Sequenzen repräsentativer Klone 53
2.6. cDNA Sequenz des HLA-B27 Antigens 57

3. DISKUSSION 60
3.1. Nukleotidvergleich der HLA-B27 Sequenz mit bekannten HLA-Sequenzen 60
3.2. Die abgeleitete Proteinsequenz von HLA-B27 im Vergleich mit bekannten Peptidsequenzen 66
3.3. Sequenzmarker der klassischen HLA Klasse I Moleküle 69

3.4. Überlegungen zur Evolution der HLA Gene 74
3.5. Überlegungen zur Assoziation HLA-B27 und Ankylosierende Spondylitis 76

4. MATERIAL UND METHODEN 78
4.1. Material 78
4.1.1. Verwendete Chemikalien 78
4.1.2. Radiochemikalien 80
4.1.3. Enzyme 80
4.1.4. Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide 80
4.1.5. Zellinien 81
4.1.6. Medien 81
4.1.7. Häufig verwendete Puffer und Lösungen 83
4.1.8. Sonstiges 83

4.2. Methoden 84
4.2.1. Zellkultur 84
4.1.2. Häufig verwendete Methoden 84
4.2.3. RNA Arbeiten 85
4.2.3.1. Isolierung von RNA 85
4.2.3.2. Größenauftrennung über Saccharosegradient 87
4.2.3.3. Hybridselektion von RNA 88
4.2.3.4. RNA Agarosegel-Elektrophorese 90
4.2.3.5. RNA Transfer und Immobilisierung auf Nitrozellulose 91
4.2.3.6. RNA Hybridisierung 92
4.2.3.7. In vitro Translation und Immunpräzipitation 93
4.2.4. cDNA 94
4.2.4.1. Synthese des 1. Strangs 94
4.2.4.2. Synthese des 2. Strangs 95
4.2.4.3. S1-Nuklease Reaktion der ds cDNA 95
4.2.4.4. Homopolymeres Tailing der cDNA 96
4.2.5. DNA Arbeiten 97
4.2.5.1. Isolierung von DNA 97
4.2.5.2. DNA Spaltung mit Restriktionsenzymen 100
4.2.5.3. DNA Agarosegel-Elektrophorese 101
4.2.5.4. Isolierung von DNA Fragmenten 102
4.2.5.5. Radioaktive Markierung von DNA 103
4.2.5.6. DNA Transfer und Immobilisierung auf Nitrozellulose 104
4.2.5.7. DNA Hybridisierung 106
4.2.6. Proteinarbeiten 107
4.2.6.1. Biosynthetische Markierung von Zellen 107
4.2.6.2. Immunpräzipitation 107
4.2.6.3. Protein Polyacrylamidgel-Elektrophorese 107
4.2.7. Klonieren von DNA 109
4.2.7.1. Klonieren von cDNA in pBR322 109

4.2.7.2. Subklonieren im M13-Phagen 111

4.2.8. Sequenzieren von DNA 113

4.2.8.1. Didesoxy-Methode 113

4.2.8.2. Maxam & Gilbert-Protokoll 114

4.2.8.3. Sequenziergele 115

LITERATURVERZEICHNIS 117

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN 127

ABKÜRZUNGEN 129

DANKSAGUNG

LEBENSLAUF

ZUSAMMENFASSUNG

Innerhalb der Histokompatibilitatsantigene, die aufgrund erhöhter Frequenz bei diversen Erkrankungen als genetische Risikofaktoren eingestuft werden müssen, ist HLA-B27 einzigartig, da es die stärkste Assoziation dieser Art aufweist. Seine Anhäufung bei einer Reihe von rheumatoiden Erkrankungen, darunter ganz besonders bei Ankylosierender Spondylitis, findet man in ahnlichem Maß in allen ethnischen Gruppen, bei denen es beschrieben wurde.

Um seine Primarstruktur zu analysieren, wurde eine cDNA Bank einer autozygoten B-Zellinie etabliert, welche HLA-B27, HLA-Cw1 und das bereits klonierte HLA-A2 Antigen exprimiert. Mit Hilfe einer HLA Sonde wurden aus den rekombinanten Klonen cDNA Kandidaten von Interesse isoliert und aufgrund differenzieller Hybridisierung sowie spezifischer Restriktionsmuster in Homologiegruppen eingeteilt. cDNA Sequenzdaten ermöglichten eine eindeutige Zuordnung von Klonen zu den jeweiligen HLA-ABC Loci der Zelle. Die HLA-B27 mRNA enthält alle strukturellen Eigenheiten wie auch die Codonvariabilität eines typischen HLA Klasse I Transkripts, spezifiziert jedoch zusätzlich zwei ungewöhnliche Aminosäureaustausche: ein potentiell reaktives Cystein in Position 67 und ein Serin in Position 131. Die letzte Substitution könnte funktionelle Konsequenzen haben, da sie in einer konservierten Region stattfand; diese Position wird in sämtlichen bislang bekannten Sequenzen immer durch eine speziesspezifische basische Aminosaure eingenommen, ein Arginin beim Menschen und ein Lysin bei der Maus.

Die Zugänglichkeit der kompletten HLA-B27 und der partiellen HLA-Cw1 Primärstrukturen fuhrt zur Erkennung von diagnostischen Sequenzmarkern fur HLA Klasse I Antigene,

welche hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, in der transmembranen und zytoplasmatischen Region vorgefunden werden. Diese Daten werden in ihrer Bedeutung hinsichtlich bestehender Evolutionsmodelle der Histokompatibilitätsantigene diskutiert.

1. EINLEITUNG

Eine zentrale Rolle in der Biologie vielzelliger Organismen kommt der Fähigkeit zu, zwischen "selbst" und "fremd" unterscheiden zu können. In der Evolution wurde der Bedarf nach einem solchen Mechanismus sehr früh evident. Schon Vertreter der Metazoa besitzen ein derartiges Diskriminierungssystem, welches aufgrund von Strukturen der Zelloberfläche eine Zuordnung "selbst" und "fremd" vornimmt und entsprechend dieser Erkennung mit einem Effektorsystem reagiert (Hildemann 1979). Ähnliche Systeme wurden bei Echinodermata (Travers, Meeting Abstract #85) und bei primitiven Chordata (Danska, Meeting Abstract #81) beschrieben. Die zunehmende Komplexität der Organismen erforderte zur Erhaltung der Integrität ein ebenso komplexeres System, welches die Funktion wahrnimmt, die man als Immunantwort bezeichnet.

Lange Zeit galten Antikörper als alleinige Träger der Immunreaktion, bis ihnen 1937 (Gorer 1937) eine zweite Gruppe von Molekülen als gleichwertig gegenübergestellt wurde (eine Übersicht bietet Götze 1977). Sie konnte serologisch und/oder zellulär definiert werden; da sie, bei nicht absolut vorhandener Identität als Ursache für Gewebsabstoßung erkannt wurde. Die Vertreter dieser neuen Klasse von Molekülen wurden Histokompatibilitätsantigene genannt; die für sie kodierenden Gene wurden im Maussystem der H-2 Region (Gorer 1948) und beim Menschen der HLA (human leucocyte antigen) Region (siehe Curtoni 1967) zugeordnet. Bereiche, welche später in Komplex umbenannt wurden, da sie eine Vielzahl von Genen für unterschiedliche Produkte enthalten. Die übergreifende und speziesunabhängige Bezeichnung ist Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC = major histocompatibility complex); sie weist darauf

hin, daß Nebenhistokompatibilitatssysteme existieren (minor histocompatibility systems, siehe Snell 1976).

1.1. Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)

Obwohl die Existenz von Produkten des MHC ursprünglich aufgrund von Transplantatabstoßung angenommen wurde, erfolgte deren Charakterisierung hauptsächlich durch serologische Reagenzien (siehe van Rood 1962). Für Studien an humanem Material wurden Alloantiseren aus Blut von Frauen gewonnen, die nach wiederholter Schwangerschaft Antikörper gegen väterliche Antigene entwickelt hatten, welche auf fötalen Zellen exprimiert sind. Im Maussystem konnten sehr gute Seren nach Immunisierung kongenischer Mäuse isoliert werden, die sich bei genetisch identischem Hintergrund nur im MHC, oder Teilbereichen davon, unterschieden. Die Verwendung von monoklonalen Antikörpern (Brodsky 1979) steigerte Sensitivität und Aussagegenauigkeit dieser Art von Analysen erheblich.

Das auffallendste Charakteristikum dieser im MHC kodierten Moleküle, ihr ausgeprägter Polymorphismus, führte dazu, daß in einer Population eine unglaubliche Vielzahl von Allelen der einzelnen, eng gekoppelten Loci beschrieben worden sind und noch werden (Klein 1979, Albert 1984). Studien, bei denen lymphoide Zellen mit einer als fremd erkannten Struktur auf der Oberflache in Anwesenheit von antigenspezifischen, cytotoxischen T-Zellen (CTL = cytotoxic T-lymphocyte) getötet werden, bilden ein zusätzliches Instrument zur Definition von Varianten. Demnach sind Allele eines bestimmten MHC Locus definiert durch die Segregation der Spezifität von Antikörpern und/oder zellulären Allo-Reaktivitätsmustern.

Rekombinationsstudien bei ingezüchteten Mausstämmen und Deletionsmutanten sowie Familienanalysen im humanen System ermöglichten die Aufstellung genetischer Karten der MHC-Region (siehe Abb.1). Molekularbiologische Untersuchungen führen zur Zeit zu einer Feinstkartierung dieses Bereiches und mit Hilfe gentechnologischer Ansätze in naher Zukunft wahrscheinlich auch zu einer eindeutigeren funktionellen Zuordnung einzelner Histokompatibilitätsantigene.

1.2. Organisation des MHC

Die Lokalisierung des MHC-komplexes auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 beim Menschen (van Someren 1974) und des Chromosoms 17 bei der Maus (siehe Klein 1975) war durch somatische Zellhybride möglich. Funktionelle und strukturelle Kriterien führten zur Unterteilung der Produkte dieser Region in drei Hauptgruppen. Nachfolgend aufgelistet sind die des humanen MHC, unter nur gelegentlicher Bezugnahme auf das sehr ähnliche Maussystem.

Bei den Molekülen der Klasse III handelt es sich um unterschiedlich stark polymorphe Faktoren des Komplementsystems. Die Produkte der eng benachbarten Loci sind sezernierte Glykoproteine der Leber und Makrophagen, C2, C4, sowie der Faktor B des alternativen Aktivierungsweges der Komplementkaskade. Zusätzlich befinden sich in diesem Bereich des MHC zwei Gene, die für einen Vertreter der P450 Enzymfamilie kodieren, die 21-Hydroxylase, ein Enzym des Steroidstoffwechsels (White, Meeting Abstract #125, Amor 1985). Obwohl moglicher Selektionsdruck auf diese Gene, zusammengefaßt als MHC Klasse III, ebenfalls die Loci der Klasse I und II beeinflussen kann, existiert keine direkte Beziehung funktioneller Art zwischen

den Produkten dieser Regionen.

Im Gegensatz zur relativ heterogenen MHC Klasse III Gruppe werden in der Klasse II des MHC strukturell einheitliche Moleküle zusammengefaßt. Dabei handelt es sich um Glykoproteine, die aus zwei unterschiedlich stark polymorphen Ketten bestehen, einer α-(35kD) und einer ß- Kette (28kD), welche nicht kovalent verknüpft vorliegen (Kratzin 1981). Daten von Immunpräzipitaten aus Zellysaten zeigen, daß diese dimere Struktur häufig mit einer invarianten Kette von 30kD assoziiert auftritt (Charron 1979), deren Gen jedoch nicht in der MHC Region lokalisiert ist. Die Moleküle dieser Gruppe sind in der Zellmembran verankert und weisen eine gewebsspezifische Verteilung mit induzierbarem Charakter auf. Sie sind auf komplexe Weise in der Interaktion von immunkompetenten Zellen und somit in der Regulation der Immunantwort beteiligt (Ferrone 1978, Sasazuki 1978). Molekularbiologische Analysen zeigen die Existenz von mehreren Genen fur die beiden Ketten, die bei der Maus zwei Untergruppen, I-E und I-A, beim Menschen mehreren Loci, DP, DR, DQ und DZ, zugewiesen werden konnen (Übersicht in Möller 1985). Interessanterweise wurden Austausche der α- bzw. ß-Ketten innerhalb der verschiedenen Untergruppen nicht gefunden (pers. Mitteilung D. Capra), obwohl die Primärstrukturen dieser Genprodukte extrem ähnlich sind.

Die Klasse I des MHC beinhaltet Moleküle, die im Kontext der vorliegenden Arbeit von Bedeutung sind und daher detaillierter besprochen werden sollen. Zwei Kategorien von ähnlich aufgebauten Produkten werden unterschieden. Die sogenannten "klassischen" Klasse I Moleküle der HLA Region im engeren Sinn: HLA-A, -B und -C; bei der Maus H-2K, D, L und (R), sind

extrem polymorph und Transkripte von wahrscheinlich je einem funktionellen Gen aus mehreren, im dafür verantwortlichen Bereich vorgefundenen Genen. Telomer davon ist auf dem Chromosom ein DNA Abschnitt lokalisiert, welcher durch Daten von Klonierungsexperimenten im Maussystem sehr gut (Steinmetz 1982, 1983, Weiss 1984) und durch Deletionsmutanten im humanen System erst grob charakterisiert ist (Orr 1983). Die Produkte der hier lokalisierten Gene werden als "nicht klassische" Klasse I Antigene bezeichnet und bei der Maus der Qa/TLA-Region zugeordnet. Sie weisen einen nur äußerst geringen Polymorphismus auf, was ihre Untersuchung erschwert und zeigen, soweit bekannt, eine restringierte Expression, die jedoch noch keinerlei Schlüsse auf ihre Funktion ermöglicht.

Mit Hilfe der als "Southern-Hybridisierung" bekannten Methode liegt die Schätzung hinsichtlich der Anzahl von Klasse I Genen bei 20 bis 30 per haploidem Genom (Cami 1981, Steinmetz 1983, Orr 1983). Der Großteil der Gene kommt bei der Maus in der Qa/TLA-Region vor (Steinmetz 1982), eine Situation, die beim Menschen wahrscheinlich ähnlich ist.

Zusammengefaßt aufgeführt sind die im MHC lokalisierten Bereiche in Abbildung 1. In dieser recht groben Darstellung werden die tatsächlichen Abstände der Klassen (I, II und III) zueinander nicht berücksichtigt. Die in der Abbildung verwendeten Symbole sollen nur die Art und Zuordnung der Produkte hervorheben, sie besitzen keinerlei quantitative Aussage.

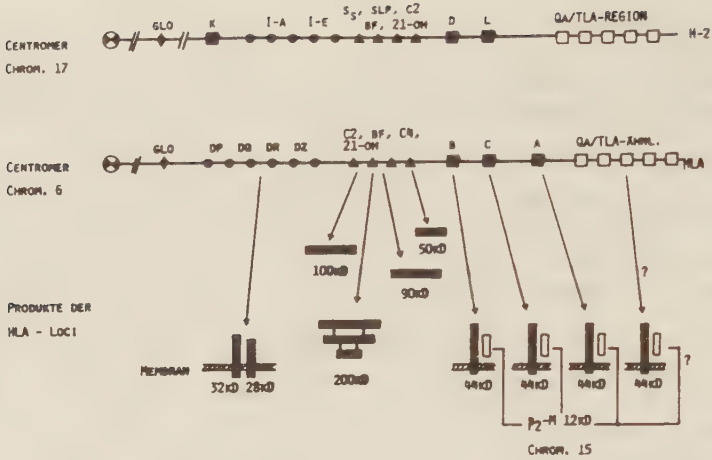


Abb.1 Organisation des MHC beim Menschen (HLA, auf Chromosom 6) und bei der Maus (H-2, auf Chromosom 17) (modifiziert nach Klein 1981)

■ : Regionen, die für die "klassischen" Klasse I Antigene kodieren

□ : Regionen, welche für "nicht klassische" Klasse I Produkte kodieren

• : Bereiche, die die Gene für MHC Klasse II Moleküle enthalten

▲ : chromosomaler Abschnitt, der für MHC Klasse III Produkte kodiert, einschließlich dem Enzym des Steroidstoffwechsels 21-Hydroxylase

GLO : Gen für das Enzym Glyoxylase I

1.3. MHC Klasse I

1.3.1 Aufbau der Gene

Klasse I Moleküle der Spezies Mensch und Maus besitzen starke Homologie. So wurde das erste menschliche Gen, das für ein HLA-Produkt dieser Gruppe verantwortlich ist, mittels einer cDNA Sonde aus dem Maussystem isoliert (Malissen 1982). Obwohl es aufgrund verschiedener Kriterien als Pseudogen (Malissen 1982) und/oder wegen seiner Sequenz und eventuellen chromosomalen Lokalisation als ein Vertreter eines "nicht-klassischen" Klasse I Gens (Biro 1985) eingestuft werden muß,

ist sein Aufbau (siehe Abb.2) charakteristisch für alle bislang isolierten funktionellen HLA Gene: A2 (Koller 1985), Aw24 (N'Guyen 1985), A3 (Strachan 1984), B7 (Biro 1985), Cw3 (Sodoyer 1984).

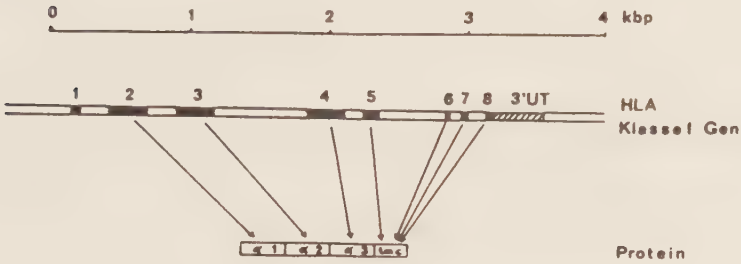


Abb. 2 Typischer Aufbau eines HLA Klasse I Gens.

- (1-8): spezifizieren die jeweiligen Exons, unterbrochen von nicht kodierenden Bereichen (Introns). Die zugehörigen Produkte dieser Exons auf Proteinebene sind: Signalpeptid, die Domänen α1, α2 und α3, transmembrane (tm) und zytoplasmatische (c) Region.
- (3'UT): enthält den 3' Teil des Gens, der in der mRNA vorkommt, aber nicht translatiert wird.

Über eine Länge von etwa 4000 Nukleotiden sind die im Protein wiederzufindenden Regionen (Exon 1-8) durch nicht kodierende Bereiche (Intron 1-7) voneinander getrennt. Dabei stammen die von Proteindaten postulierten Domänen jeweils von einem Exon ab - die einzige Ausnahme bildet die zytoplasmatische Region des Moleküls, deren kodierender Anteil in mehreren Exons enthalten ist.

Die Regulation der Genexpression bei dieser Gruppe von Molekülen ist noch vollkommen unbekannt; ein Mechanismus

ähnlich dem der Immunglobuline, d.h. Expression nach genomischem Rearrangement, wurde im MHC nicht vorgefunden.

1.3.2. Struktur der Produkte

Die Produkte der HLA Klassse I Gene sind Glykoproteine mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 44.000. Sie bilden, in nicht kovalenter Assoziation mit $ß_2$-Mikroglobulin als leichter Kette (Grey 1973), dimere Membrankomponenten. In einzelnen Fällen wurden auch sezernierte HLA Klasse I Antigene beobachtet (Krangel, Meeting Abstract #43). $ß_2$-Mikroglobulin ist ein Peptid von etwa 12kD, welches innerhalb einer Spezies kaum polymorph ist; sein Gen liegt außerhalb des MHC, auf Chromosom 15 beim Menschen (Goodfellow 1975) und Chromosom 2 bei der Maus (Goding 1981).

Die Anordnung von schwerer und leichter Kette, sowie die Art der Wechselwirkung mit der Plasmamembran stellt man sich aufgrund bisheriger Daten und noch ausstehender Strukturanalysen so vor, wie es das recht simplifizierte Modell der Abbildung 3 zeigt.

Das Molekül enthält einen extrazellulären, transmembranen und zytoplasmatischen Teil. Der extrazelluläre Bereich ist aus drei etwa gleichgroßen, je 90 Aminosäuren umfassenden Domänen aufgebaut (α1, α2 und α3). An der Interaktion mit $ß_2$-Mikroglobulin ist hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, die dritte, der Membran direkt benachbarte Domäne beteiligt. Am Übergang von α1 zu α2 befindet sich die einzige N-Glykosylierungsstelle der HLA Moleküle, während die entsprechenden Antigene der Maus zwei bzw. drei derart verknüpfte Zuckerreste aufweisen (Ploegh 1981). α2 und α3 sind durch je eine interne Disulfidbrücke mit konservierter Position gekennzeichnet. Das

in der Membran eingelagerte Segment umfaßt rund 40 Positionen und besteht aus einer Aneinanderreihung von hydrophoben Aminosäuren. Der intrazytoplasmatische Teil des Moleküls ist aus 25 bis 27 hydrophilen Aminosaureresten zusammengesetzt, von denen einige in vivo phosphoryliert vorliegen (Ploegh 1981).

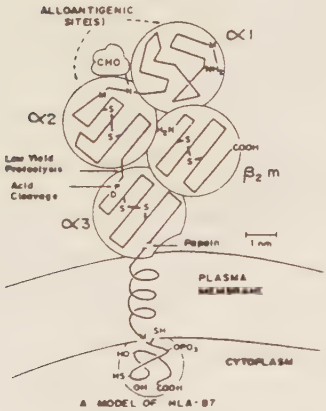


Abb. 3 Schematische Darstellung der Struktur eines HLA Klasse I Antigens (HLA-ABC)

(Abbildung entnommen aus Strominger 1980)

1.3.3. Homologie zu den Immunglobulinen

MHC Klasse I Antigene und Immunglobuline sind beide an der immunologischen Überwachung eines Organismus beteiligt. Viele Autoren bewerten daher eine Reihe von Ähnlichkeiten auf struktureller und genetischer Ebene sehr stark und versuchen einen eventuell gemeinsamen Ursprung in der Evolution dieser Moleküle zu finden (siehe z.B. Cushley 1983).

In beiden Fällen handelt es sich um dimere Moleküle, bestehend aus einer leichten und schweren Kette, wobei erst die Assoziation mit der leichten Kette zur Expression auf der Zelloberfläche führt (Arce-Gomez 1978, Valle 1981). Die Ketten zeigen domänenhaften Aufbau mit konservierten Disulfidbrücken. Ein gewisser Grad an Sequenzhomologie kann zwischen β_2-Mikro-

globulin und konstanten Immunglobulindomänen bestimmter Isotypen festgestellt werden (vgl. Ploegh 1981). Multigenfamilien kodieren sowohl für HLA Klasse I Moleküle als auch für Immunglobuline.

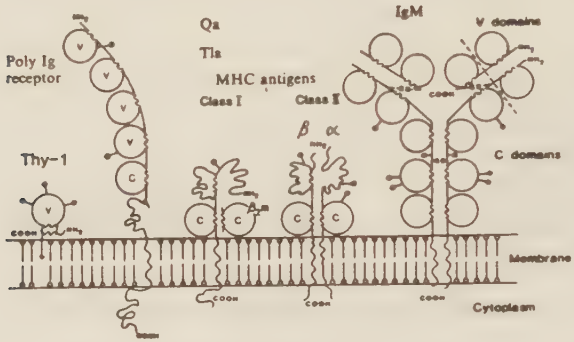


Abb. 4 Strukturhomologien bei Molekülen der Ig-Superfamilie (entnommen aus Williams 1984)

Die Signifikanz solcher Ähnlichkeiten , besonders hinsichtlich funktioneller Überlegungen, ist unklar. Zum einen kann diese Homologie strukturelle Zwänge, vorgegeben durch die Primärstruktur verwandter Gene, widerspiegeln. Anderseits könnte die Domäne des Immunglobulins eine grundsätzliche Aufbaueinheit sein, welche für zelluläre Interaktionen eingesetzt wird (Cushley 1983). Eine Stütze dieser Vorstellung bilden Befunde weiterer immunologisch relevanter Moleküle und ihrer postulierten Struktur (siehe Abb. 4 und Williams 1984).

1.3.4. Vorkommen und Funktion der Antigene

HLA Klasse I Moleküle im engeren Sinn (HLA-A, -B und -C) werden in unterschiedlicher Dichte auf der Oberfläche fast aller kernhaltiger Zellen exprimiert - wahrscheinliche Aus-

nahmen: Trophoblast und Spermien (Brodsky 1979). Diese allgemeine Verbreitung läßt auf eine prinzipielle Funktion schließen, über die jedoch keinerlei übereinstimmende Vorstellung herrscht. Sicher ist, daß diese Moleküle Spezifitäten darstellen, über die zellulare Interaktionen vermittelt werden (siehe Klein 1981). Beispiele einer derart allgemeineren Rolle bei der Immunantwort sind zum einen Abstoßungsreaktionen, wie auch beim Menschen gezeigt (Goulmy 1977), des weiteren Eliminierung von z.B. virusinfizierten Zellen (Dickmeiss 1977). Hierbei wird ein Vorläufer der T-Zellreihe durch die infizierte Zelle zur Differenzierung in einen cytotoxischen Lymphozyten angeregt. Die Reaktion der cytolytischen T-Zelle auf das Fremdantigen geschieht im Zusammenhang mit der Erkennung von "selbst", d.h. im genannten Beispiel wird dieses und nur dieses virale Antigen zusammen mit dem HLA Klasse I Molekül erkannt. Die gleiche T-Zelle zeigt keinen Effekt bei der Präsentation desselben viralen Antigens im Kontext mit einem anderen HLA Klasse I Molekül als dem, durch welches sie induziert wurde. Dieses Phänomen wird als HLA, im Maussystem entsprechend H-2, Klasse I Restriktion bezeichnet (Zinkernagel 1974, 1979).

1.3.5 Polymorphismus

Der stark ausgeprägte Polymorphismus der "klassischen" HLA Klasse I Produkte (HLA-ABC) hat zur Entdeckung einer Vielzahl von Allelen der drei Loci geführt. Die serologisch definierte Anzahl beläuft sich momentan auf 23 HLA-A, 49 HLA-B und 8 HLA-C Spezifitäten (siehe Albert 1984, 1985). Zusätzlich werden mit Hilfe weiterer monoklonaler Antikörper und auch mit CTL-

Analysen Aufspaltungen einzelner Spezifitaten in Subtypen vorgenommen. Während bei HLA-A und HLA-B die Leerstellen der Genfrequenzen fur die großen ethnischen Gruppen fast vollständig aufgefüllt sind (> 98%), bedarf es noch subtilerer Reagenzien, um dieses Ziel auch für den HLA-C Locus (erst ca. 50% der Allele definiert) zu erreichen (siehe Thomson 1981).

Bei der Ausbildung von allogenen Determinanten der MHC Klasse I Moleküle sind hauptsächlich die extrazellulären Domänen α1 und α2 beteiligt. Direkte Beweise dafür liefern serologische und zelluläre Analysen von natürlichen und experimentell induzierten Mutanten, z.B. durch Exonshuffling (Englehard, Meeting Abstract #92, Herman #100). Dabei werden mittels molekularer Techniken einzelne Domänen oder nur Teilbereiche davon zwischen Produkten verschiedener MHC Loci ausgetauscht und die Reaktivität des exprimierten, rekombinanten Produkts analysiert. Sequenzvergleiche der betreffenden Regionen ermöglichen eine Lokalisierung der für die veränderte Reaktivität verantwortlichen Primärstruktur. Da jedoch nicht bekannt ist, welche Bereiche dieser beim nativen Molekül benachbart sind, kann keinerlei Aussage darüber getroffen werden, ob die veränderte Reaktivität einer Spezifität durch direkte Umstrukturierung des relevanten Epitops oder aber indirekt, durch intramolekulare Wechselwirkung mit entfernteren Regionen zustandekommt. Der Versuch einer Epitopkartierung, durch Inhibition von Antikörper- bzw. CTL-Bindung mit synthetischen Oligopeptiden definierter Sequenz, brachte bisher diesbezüglich keinen eindeutigen Beitrag.

Das Bild des vorgefundenen Polymorphismus in den beiden N-terminalen Domanen dieser Molekule auf der Ebene der Primärstruktur ist das eines Mosaiks, bei welchem eine beschränkte

Anzahl von Bauelementen vorgegeben ist, mit der jedoch eine Vielzahl von Kombinationen erzeugt werden kann. Die wenigsten der Austausche sind einmalig; meist werden kurze aufeinanderfolgende Sequenzstücke an gleichen Positionen in verschiedenen Molekülen und damit in unterschiedlicher Umgebung vorgefunden. Dabei scheint innerhalb der Familie HLA Klasse I keine Beschränkunk beim Austausch dieser Segmente zu bestehen, weder hinsichtlich Locus noch Entfernung.

Die dabei wirksamen Mechanismen sind noch unklar und ihre Analyse wird erschwert durch die Tatsache, daß unterschiedliche und diskriminierende Mechanismen postuliert werden müßten, um einerseits die extreme und gleichzeitig dennoch eingegrenzte Variabilität in einem Teil des Moleküls, anderseits eine spezifische Konservierung (siehe Diskussion) in anderen Regionen des gleichen Moleküls zu erklären. Klar ist, daß Punktmutation, ungleiches Crossing Over, und damit einhergehend Genexpansion und -kontraktion, mitbeteiligt sind, als Erklärung jedoch nicht ausreichen. Ein weiterer in diesem Zusammenhang vorgeschlagener Mechanismus ist Genkonversion (Bregegere 1983), wobei postuliert wird, daß ein Segmentaustausch durch "Donor-" und "Akzeptor-"verhalten von HLA Genen zustandekommen soll. Für Mutanten der H-2 Klasse I Antigene bei der Maus wurden Gene aus der Qa/TL Region als mögliche "Donorgene" angesehen (Mellor 1983). Über die molekularen Vorgänge dabei existiert jedoch noch keinerlei zufriedenstellende Vorstellung.

Theoretische Erklärungsversuche fur eine mögliche selektive Basis des extremen Polymorphismus dieser Molekulgruppe gibt es schon seit längerer Zeit. Argumentiert wird, daß Varianten durch die Funktion der HLA Produkte bevorzugt werden. Eine

der Überlegungsrichtungen ist die (Bodmer 1972), daß Pathogene diese Moleküle als Rezeptor nutzen könnten oder antigenisches Mimikry bewerkstelligen. Durch neue Varianten hätte der Wirt einen Vorsprung für eine gute Abwehr und somit einen selektiven Vorteil. Allerdings liegen für diese theoretischen Spekulationen keine Beweise vor.

1.4. HLA und Krankheit

Für eine Reihe von Produkten der HLA Region konnte gezeigt werden, daß sie mit einer Anzahl von chronischen Erkrankungen, bei welchen meist alle Organsysteme in Mitleidenschaft gezogen werden, assoziiert auftreten. Dabei wird unter Assoziation die Tatsache verstanden, daß ein bestimmtes Allel in der Gruppe der erkrankten Personen eine signifikant erhöhte Frequenz im Vergleich zu einer Kontrollpopulation aufweist. Die Krankheiten mit HLA Assoziation zeigen keine einfache Segregation nach Mendel, in den meisten Fällen jedoch eine erbliche Komponente und häufig inkomplette Ausprägung in Abhängigkeit von Umweltfaktoren, die eine Suszeptibilität hemmen oder begünstigen. Sie scheinen wenig selektive Signifikanz zu haben, da sie entweder sehr selten sind, erst spät im Leben zum Ausbruch kommen oder kaum Effekt auf Lebensfähigkeit und Fertilität haben (siehe Thomson 1981).

Eine Assoziation der genannten Art kann sehr schnell aus einer 2x2 Tafel ersehen werden, in welcher An- oder Abwesenheit von Krankheit versus Antigen in Patienten- und Kontrollpopulation gegenübergestellt werden.

2 x 2 Tafel

		ANTIGEN		
		+	-	
KRANKHEIT	+	a	b	N_1
	-	c	d	N_2

Dabei gibt N_1 die Anzahl der getesteten Patienten an, wobei "a" die Träger des Antigens sind - d.h. für den Fall der coexprimierten HLA Antigene, daß sowohl die homozygoten, wie auch die heterozygoten Genotypen erfaßt sind - während die "b" Individuen dieses Antigen nicht aufweisen. Analoges gilt für die Kontrollgruppe N_2.

Aus diesen Angaben kann die Frequenz des Antigens in der Patientengruppe (FAD = frequency of antigen among diseased = a/N_1) und der Kontrollgruppe (FAP = frequency of antigen in the population = c/N_2) ermittelt werden. Ein weiterer in diesem Zusammenhang häufig benannter Faktor ist das relative Risiko (RR), welcher als Hinweis angesehen werden kann, um wieviel häufiger die untersuchte Krankheit bei Individuen mit dem fraglichen Antigen ausbricht im Vergleich zum Personenkreis, der dieses Antigen nicht hat. Das relative Risiko wurde von Woolf (1955) und Haldane (1955) in einen mathematischen Ausdruck gefaßt:

$$RR = ad/bc = FAD(1-FAP)/(1-FAD)(FAP)$$

Die "ätiologische Fraktion" (auch "zuordenbares Risiko" genannt), ein Parameter zur Abschätzung der Assoziationsstarke zwischen einem HLA Antigen und der damit verbundenen Krankheit, wurde aus epidemiologischen Studien (Miettinen 1976) übernommen und gibt an, welcher Anteil der Krankheit dem MHC Antigen zugeschrieben werden kann. Der δ-Wert der nachfolgenden Tabelle entspricht diesem Faktor (Svejgaard 1983).

Der Δ-Koeffizient genetischer Analysen ist das direkteste

Maß zur Beschreibung eines Kopplungsungleichgewichtes (siehe Diskussion), da er die Differenz aus der theoretischen Kopplung zweier Gene (Produkt der Genfrequenzen) und den vorgefundenen Assoziationshäufigkeiten ist.

Tabelle 1 Beispiele einiger Krankheitsassoziationen mit HLA Antigenen

Krankheit	Antigen	FAD	FAP	RR	δ-Wert
Ankylosierende Spondylitis	HLA-B27	0,94	0,09	158	0,93
Reiter's Syndrom	HLA-B27	0,80	0,09	40	0,78
Psoriasis	HLA-Cw6	0,50	0,23	3,3	0,35
Coeliac Syndrom	Dw3	0,98	0,15	278	0,98
Juvenile Diabetes	DRw4	0,44	0,18	3,6	0,32
Multiple Sklerose	Dw2	0,70	0,16	12,3	0,64
Hämochromatose	HLA-A3	0,72	0,21	9,7	0,65

(Tabelle in stark gekürzter Form entnommen aus Thomson 1981)

Verwendete Abkürzungen:
FAD: Antigenfrequenz in der Patientenpopulation
FAP: Antigenfrequenz in der allgemeinen Population
(ausgewählte Beispiele entstammen Analysen in einer kaukasoiden Bevölkerungsgruppe)
RR: relatives Risiko, definiert wie im Text beschrieben
δ-Wert: entsprechend der im Text zugeordneten Definition

Wodurch HLA-assoziierte Erkrankungen zustandekommt ist noch unklar. Nicht erstaunlich ist dies, wenn man beachtet, daß die Funktionen des Großteils der Produkte der HLA Region noch nicht genügend charakterisiert sind und zusätzlich für die HLA-assoziierten Krankheitsbilder kein gemeinsamer Nenner gefunden werden kann (Ausnahme: eine autoimmune Ätiologie scheint für einige zuzutreffen, wie IDDM = Insulin abhängiger Diabetes mellitus, Addison'sche Erkrankung, Rheumatoide

Arthritis u.a., siehe Thomson 1977). An Modellen über das Zustandekommen einer Assoziation HLA und Krankheit mangelt es nicht. Die Theorie des molekularen Mimikry (Snell 1968), in ihren zwei Formen der Kreuztoleranz-(Ebringer 1978) bzw. Kreuzreaktivitätshypothese (Ebringer 1985) geht davon aus, daß ein Pathogen mit HLA-ähnlichen Determinanten eine geringe Immunantwort induziert, wodurch es zu chronischen Entzündungsprozessen kommen kann (Young 1978). Außerdem könnten HLA Antigene als Rezeptoren für Pathogene bzw. Hormone, Neurotransmitter oder Wachstumsfaktoren fungieren (Svejgaard 1976, Helenius 1978, Claas 1982, Edidin 1983). Eine sterische oder chemisch bewirkte Veränderung der HLA Moleküle könnte zu einer Modifikation führen, die vom eigenen Organismus als fremd erkannt wird, worauf eine entsprechende Immunantwort die Folge ist. Ein Beispiel einer derartigen spezifischen Bindung findet man im Falle des E19-Glykoproteins von Adenovirus (Signäis 1983). Eine weitere Möglichkeit wäre, daß Varianten der HLA Spezifitäten selbst, im Zusammenhang mit weiteren Faktoren durch ihre Primärstruktur verantwortlich sind für die Krankheitssuszeptibilität. Schließlich wird auch postuliert, daß einzelne HLA Spezifitäten aufgrund eines Kopplungsungleichgewichtes mit einem sogenannten "Suszeptibilitätsgen" eine Assoziation mit Krankheit entstehen lassen (siehe in Thomson 1977).

Dabei ist die häufigste Erklärung von HLA-assoziierten Krankheiten die Annahme, - die dann als Ausgangsbasis für weitere theoretische Überlegungen herangezogen wird - die eines Kopplungsungleichgewichts zwischen einer definierten HLA Spezifität und einem für die Krankheitsuszeptibilität verantwortlichen Gen, kurz "Krankheitsgen" genannt. Darauf aufbauend

kann mit Hilfe zweier formaler Methoden - Bestimmung der Antigenfrequenzen in einer Patientengruppe einerseits und Analyse von erkrankten Geschwistern anderseits - eine Aussage über den Vererbungsmodus getroffen werden. So entspricht die Transmissionsform des HLA-gekoppelten "Krankheitgens" mehr einem dominanten Modell für Ankylosierende Spondylitis und einem rezessiven für IDDM. Diese simplifizierten Modelle können allerdings komplexeren Vererbungsmustern häufig nicht gerecht werden. Durch bessere Auflösung und Charakterisierung der HLA Region erfolgte eine relativ starke Verschiebung der stärksten Krankheitsassoziationen von den länger bekannten HLA Klasse I in Richtung Klasse II (z.B. solche mit autoimmunem Hintergrund) oder zum Teil auch Klasse III (z.B. Adrenogenitales Syndrom). Eine in vielfacher Hinsicht beachtenswerte Ausnahme bildet das HLA Klasse I Antigen B27.

1.5. HLA-B27, Ankylosierende Spondylitis und die Problemstellung dieser Arbeit

Seit den ersten Berichten über eine Assoziation der Ankylosierenden Spondylitis (A.S.) - einer entzündlichen Systemerkrankung mit chronisch progredientem Verlauf und obligatem Befall der Kreuzdarmbeingelenke und der Wirbelsäule - wie auch einer Reihe weiterer seronegativer Arthritiden mit dem HLA-B27 Antigen (Caffrey 1973, Schlosstein 1973, Brewerton 1973), hat ein ziemlicher Forschungsaufwand zwar interessante Daten geliefert, nicht jedoch klären können, warum eine dermaßen starke Kopplung mit einem Histokompatibilitätsantigen vorgefunden wird.

Die Assoziation HLA-B27/A.S. zeigt starke familiäre Häufung; man kann die Erkrankung 5 bis 10 mal häufiger unter

HLA-B27 positiven Verwandten eines Patienten als unter Verwandten HLA-B27 positiver Kontrollindividuen finden. Auffallend ist ein bevorzugter Befall des männlichen Geschlechts, wobei allerdings Angaben diebezüglich je nach Studie sehr schwanken, von 10:1 bis 1:1 (Parker 1980, Genth 1985).

Betrachtet man eine kaukasoide HLA-B27$^+$ Population, so haben etwa 20% in einer auffälligen Form Rückgratbeschwerden (McDevitt 1979) und etwa 2% (Parker 1980) weisen A.S. Symptome auf (unter Miteinbeziehung sämtlicher Schweregrade). Werte in diesen Größenordnungen erhalten auch Kidd, Ceppellini und Mitarbeiter (Kidd 1977) auf rechnerischem Wege unter der Annahme eines "zwei Gene"-Modells (vgl. vorhergehendes Kapitel), mit dem der Vererbungsmodus des A.S. "Krankheitgens", im Kopplungsungleichgewicht mit HLA-B27, als hauptsächlich dominant beschrieben wurde. Die Frequenz des A.S. "Suszeptibilitätgens" wurde hierbei mit 0,022 angesetzt, fast ausschließlich (93%) gekoppelt mit HLA-B27; die Penetranz wurde dabei auf 38% geschätzt. Durch diese Werte konnten die Autoren jedoch nicht ausschließen, daß es das HLA-B27 Antigen selber ist, welches die Suszeptibilität für A.S. enthält. Das Maß der Assoziation HLA-B27$^+$/A.S. ist extrem und einzigartig (relatives Risiko RR=87-300; zuordenbares Risiko δ=0,93; siehe dazu Tabelle 1 in Kapitel 1.4 und nachfolgende Tabelle); diese besondere Stellung besteht nicht nur hinsichtlich der HLA Klasse I Moleküle, sondern auch, wenn sämtliche Produkte der HLA Region in diesen Vergleich miteinbezogen werden. Die Assoziation ist jedoch nicht 100%, in keiner größer angelegten Analyse der bisher untersuchten Populationen.

Tabelle 2 Assoziation von HLA-B27 mit A.S. in verschiedenen ethnischen Gruppen

Ethnische Gruppe	Patienten Anzahl	Patienten % Pos.	Kontrolle Anzahl	Kontrolle % Pos.	RR	Anzahl Studien
Kaukasoide	2022	79-100	16162	4-13	87	29
Juden	38	79	456	3	109	1
Japaner	63	67-92	167	0-2	324	2
Inder	47	80-94	160	2-3	181	2
Haida Indianer	17	100	222	51	34	1
Bella Coola I.	3	100	129	26	20	1
Pima Indianer	30	57	251	18	6	1
Iraner	25	92	400	3	349	1
USA Schwarze	23	48	60	2	36	1
Venezuelaner	19	58	303	3	41	1

(Tabelle in gekürzter Form aus Thomson 1982)

Abkürzungen: RR steht für relatives Risiko und ist im Text (Kap. 1.4.) erklärt.

Neuere Ergebnisse aus Studien an HLA-B27$^-$/A.S.$^+$ Fällen (Edmonds 1984) zeigen bei einem als A.S. identisch beschriebenem klinischem Bild (entsprechend sehr strengen Kriterien) keinerlei Kopplung mit irgendeinem weiteren bekannten Produkt der Histokompatibilitätsregion, auch nicht, wie aufgrund früherer Berichte angenommen, eine bevorzugte Häufung von HLA Klasse I Antigenen der CREG Familie (HLA-B7, -Bw22, -Bw42 und -Bw47), einer Gruppe von Molekülen, die kreuzreagierende Determinanten mit HLA-B27 aufweist. Zusätzlich konnten keine Sekundärfälle in den Familien dieser Patienten beobachtet werden.

Die Assoziation HLA-B27 und Ankylosierende Spondylitis wurde in den verschiedensten ethnischen Gruppen vorgefunden

(siehe Tabelle 2). Dabei fällt auf, daß in Populationen mit hoher HLA-B27 Frequenz (z.B. bei verschiednenen nordamerikanischen Indianerstämmen) A.S. eine häufige Erkrankung ist, anderseits in Völkergruppen, die dieses Allel praktisch nicht besitzen (afrikanische Schwarze und die Aborigines in Australien) A.S.-Fälle praktisch nicht beobachtet werden können (siehe Ebringer 1985).

Ergebnisse dieser Analysen, unter Berücksichtigung der Tatsachen, daß nicht alle HLA-B27-Träger Patienten sind und ein Teil der diagnostizierten A.S. Fälle HLA-B27 negativ ist, führten zu zwei grundsätzlichen Hypothesen bezüglich der vorgefundenen HLA-B27/A.S. Assoziation und der Pathogenese dieser Erkrankung:

1. Modell: Indirekter Einfluß von HLA-B27

Hierbei wird angenommen, daß sich HLA-B27 in einem Kopplungsungleichgewicht mit einem zweiten Gen befindet, welches häufig salopp als "Krankheitsgen" oder "Suszeptibilitätsgen" bezeichnet wird (siehe Kapitel 1.4.). Dieses Gen soll die direktere Verantwortung für die Krankeit tragen. Damit könnten die HLA-B27$^-$-Fälle durch Dissoziation dieses Gens vom Histokompatibilitätsantigen B27 erklärt werden. Gegen diese Annahme spricht einerseits der Befund, daß in den Familien von HLA-B27$^-$/A.S.$^+$ Patienten keine familiäre Häufung der Krankheit gefunden werden kann, wie auch anderseits, daß diese starke Assoziation in allen ethnischen Gruppen vorkommt.

2. Modell: Direkte Beteiligung von HLA-B27

Die Verfechter dieser Theorie spalten sich in Anhänger zweier unterschiedlicher Richtungen auf. Die Arbeitsgruppe um Ebringer (Ebringer 1983, 1985) favorisiert die Kreuztoleranz-

(oder Kreuzreaktivitäts-) Hypothese; auf den konkreten Fall der A.S. angewendet postuliert diese, daß A.S. durch Mikroorganismen induziert wird, deren Oberflächenantigene partiell dem HLA-B27 ähnlich sind, d.h. mit ihm kreuzreagieren. Tatsächlich reagieren Antiseren, gewonnen aus Kaninchen nach Immunisierung mit HLA-B27$^+$ Lymphozyten, mit einer Reihe bestimmter Stämme von gramnegativen Mikroorganismen, wie Klebsiellen, Shigellen, Yersinien u.a., Bakterien, welche in der akuten Phase der Krankheit eine wesentliche Rolle spielen. Durch die Entwicklung von antibakteriellen Antikörpern könnte es letztendlich unter Komplementverbrauch zur Reaktion mit Selbstantigenen kommen, was zur Auslösung der vorgefundenen Entzündungen führt.

Im Gegensatz dazu sind die beiden australischen Gruppen um Geczy und Edmonds Anhänger der Rezeptorhypothese. Diese Theorie besagt, daß HLA-B27 und/oder eine ihm sehr eng benachbarte Oberflächenstruktur als Rezeptor für gramnegative Organismen, bzw. für nur bestimmte Produkte dieser, fungiert (Geczy 1980, Geczy 1983, Prendergast 1984, Upfold 1985). Eine derartige Bindung würde die Krankheitsauslösung hervorrufen, da antibakterielle Antikörper diese HLA-modifizierten Zellen als Zielstrukturen erkennen. Allerdings berücksichtigen beide Theorien die Tatsache der HLA-B27$^-$/A.S.$^+$ Fälle nicht.

Eine eventuell verdeckte absolute Assoziation (siehe Modell 1) konnte bislang durch Aufsplittung der HLA-B27 Spezifität in Subtypen nicht gezeigt werden. Die Definition der Subtypen durch unterschiedliche Techniken, serologisch (Grumet 1982), biochemisch (Molders 1983, Vega, Meeting Abstract # 108) und zellular (Breuning 1982, Toubert 1984) ist erst teilweise korrelierbar, aber es zeichnet sich ab, daß es wohl mehr als

drei HLA-B27 Varianten gibt, von denen allerdings keine preferentiell unter den A.S. Patienten vorkommt.

Eine naheliegende Aufgabe war nun die Untersuchung der Primärstruktur dieses genetischen Risikofaktors. Der Wahl des Ansatzes, dieses uber die Sequenzbestimmung der HLA-B27 mRNA zu erreichen, gingen folgende Uberlegungen voraus: dieser Zugang ermöglicht die Sequenzierung des kompletten Antigens; die auf diesem Weg erhaltenen Daten geben gleichzeitig Auskunft über das Transkriptions- bzw. RNA Splicing Produkt und liefern die Nukleotidinformation, welche für die Suche nach dem mutmaßlichen "Krankheitsgen" auf genomischer Ebene unentbehrlich ist; zusätzlich stellen die Ergebnisse das molekulare Werkzeug zum Test der Kreuztoleranzhypothese nach entsprechender Transfektion.

Um die Identifizierung der gesuchten HLA-B27 mRNA zu erleichtern, wurde für die Erstellung der cDNA Bank eine Zellinie verwendet, dessen Donor durch Abstammung homozygot für die HLA Region ist. Von der dadurch begrenzten Anzahl der exprimierten HLA Allele war zusatzlich das Produkt des HLA-A Locus charakterisiert. Es wurde antizipiert, daß die Unterscheidung zwischen HLA-B und HLA-C Transkripten durchführbar sein müßte, aufgrund von Homologien zu bereits bekannten Produkten der jeweiligen Serie (HLA-B7 und HLA-Cw3). Diese Annahme erwies sich als richtig, wie es die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen werden.

2. ERGEBNISSE

2.1. Charakterisierung des Ausgangmaterials

Etabliert wurde die LG-2 Zellinie (Gatti 1979) durch EBV-Transformation von peripheren B-Zellen des durch Abstammung für die HLA Region homozygoten Individuums V.I der Familie STA (Joergensen 1973).

Während der Zeit der Kultivierung wurde die HLA Expression der genotypisch homozygoten Zellen mit verschiedenen Methoden überprüft. Die Ergebnisse von Mikrozytotoxizitätsassays mit Alloantiseren (pers. Mitteilung H. Grosse-Wilde), von Einzelzell-ELISA's mit monoklonalen Antikörpern (pers. Mitteilung J. Johnson), sowie biochemischen Daten in 1D- bzw. 2D-Gelen (siehe Abb.5) zeigen die Expression der erwarteten Antigene. Somit lautet die Charakterisierung der LG-2 Zellinie für diese Region: HLA A2/A2, - B27/27, -Cw1/Cw1. Da die Zellinie Bindung mit dem diskriminierenden Antikörper M2 (Grumet 1982) zeigt, handelt es sich beim exprimierten HLA-B27 Antigen um den in einer kaukasischen Population mit einer Häufigkeit von ca. 87% vertretenen Subtyp. Dabei scheint dieser Antikörper dieselben Antigene zu definieren, die in biochemischen Studien unter der Bezeichnung HLA-B27 Typ W (Mölders 1983) geführt werden.

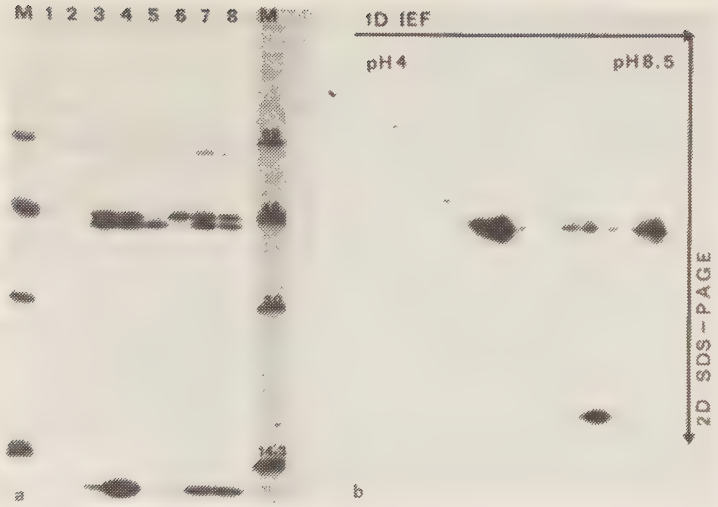


Abb. 5 Immunpräzipitierte HLA Klasse I Antigene aus biosynthetisch markierten Produkten der LG-2 Zelle

a.) eindimensionale Analyse (12,5% SDS-PAGE)
bei den Immunpräzipitationen 1-6 wurden monoklonale Antikörper eingesetzt
M: Markerproteine, MG x 10^{-3}
1: Negativkontrolle, anti HLA-DR6
2: Negativkontrolle, anti HLA-B7
3: Antikörper gegen monomorphe Determinanten von HLA Klasse I Antigenen
4: Antikörper gegen humanes $ß_2$-Mikroglobulin
5: Antikörper gegen HLA-A2
6: Antikörper gegen HLA-B27
7: Ig-Fraktion aus Kaninchenantiserum gegen denaturierte schwere Ketten von HLA Klasse I Antigenen
8: wie bei 7

b.) zweidimensionale Analyse (1.D: IEF, 2.D: 10% SDS-PAGE)
eines Präzipitats wie in a) 3
44 kD Peptide: basischer IEP HLA-A2
saurer IEP HLA-B27
12 kD Peptid: $ß_2$-Mikroglobulin
Die sichtbare relative Homogenität der Immunpräzipitate ist in Übereinstimmung mit der Homozygotie der LG-2 Zelle.

2.2. RNA Präparation von der B-Zellinie LG-2

2.2.1. RNA Extraktion und Anreicherung von HLA spezifischer mRNA

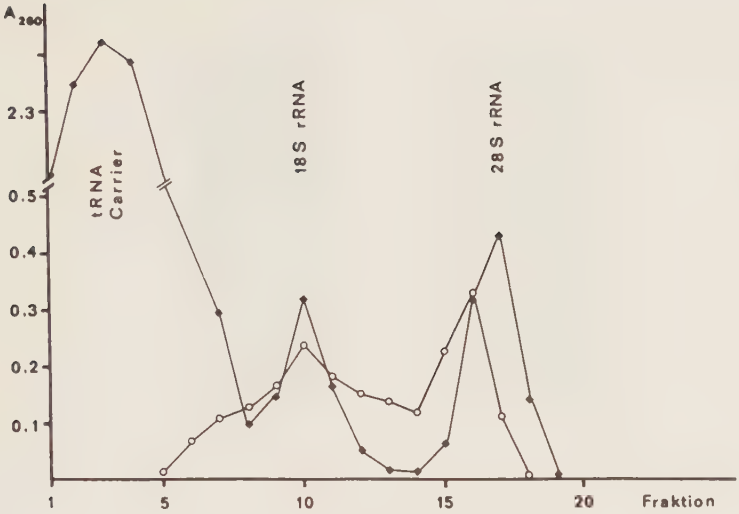
Ausgehend von $5,6 \times 10^9$ kultivierten B-Zellen konnten 52mg RNA ($1A_{260}$ = 40ug/ml) isoliert werden. Methodenbedingt besteht diese Präparation hauptsächlich aus ribosomaler (rRNA) und Boten-RNA (mRNA). Unter der Annahme eines Durchschnittswertes von 10pg solcher RNA Spezies pro Zelle, liegt die Ausbeute bei 92%. Anhaltspunkte über die Sauberkeit der Präparation geben folgende photometrischen Verhältniswerte: A_{260}/A_{280} = 1,85 (Optimum: 2,0) und A_{260}/A_{230} = 2,0 (Optimum: 2,5).

Da die für HLA Produkte kodierende mRNA nur zu einem geringen Prozentsatz vertreten ist (0,05-0,1%, siehe Ploegh 1980), wurde sie über verschiedene Möglichkeiten angereichert. Zunächst erfolgte die Isolierung von poly A^+ haltiger mRNA. In Abhängigkeit von der Qualität der jeweiligen Charge an oligo dT-Zellulose enthielt die poly A^+-RNA mehr oder weniger rRNA (1% - 50%). Von den stärker kontaminierten Präparationen wurde eine Größenauftrennung über einen isokinetischen Saccharose-gradienten (10-30%) vorgenommen.

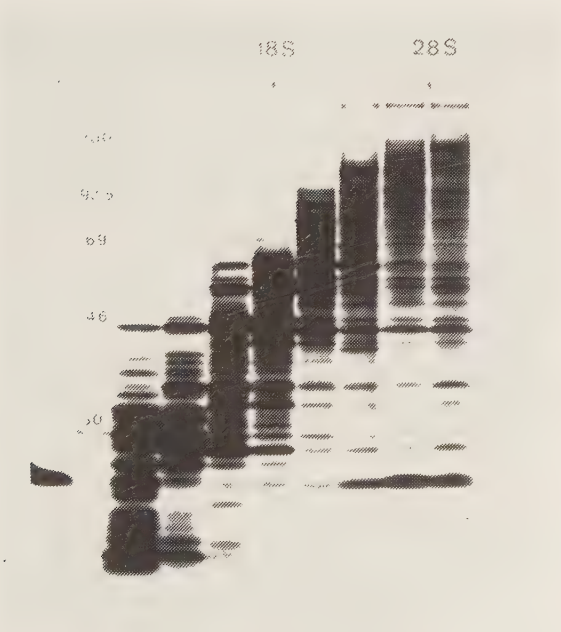
Abb. 6 Größenfraktionierung einer mRNA angereicherten RNA Präparation auf einem isokinetischen Saccharosegradienten

a.) Diagramm der RNA Verteilung nach der Ultrazentrifugation - von 30 aufgefangenen Fraktionen war optische Dichte nur bei 19 bestimmbar.
● : Kontrolle: Leber-RNA (Maus) mit zugesetzter Carrier-tRNA
O : mRNA der LG-2 Zelle (ca. 25% Kontamination an rRNA)
Beachte die mRNA Anreicherung zwischen den beiden rRNA Peaks und die gute Reproduzierbarkeit zwischen zwei Gradienten.

b.) In vitro Translation einiger Fraktionen der aufgetrennten RNA
M: Markerproteine, MG x 10^{-3}
1: Negativkontrolle, keine mRNA, nur tRNA "translatiert"
Pfeile markieren die Lage der rRNA im Saccharosegragienten.


A_{260}
2.3
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
tRNA
Carrier
18 S rRNA
28 S rRNA
1
5
10
15
20
Fraktion

a


18S
28S

b

Abb. 6

Das typische Ergebnis einer solchen Auftrennung nach Ultrazentrifugation des Dichtegradienten ist im Diagramm der Abbildung 6 dargestellt.

In vitro Translation der einzelnen Fraktionen (siehe Beispiel in Abb.6b) mit anschließender Immunpräzipitation ermöglichte eine theoretische Abschätzung des Anreicherungsgrades für HLA spezifische mRNA mit etwa 8fach, was als recht gut bezeichnet werden kann, zieht man in Betracht, daß die Größe der Klasse I Transkripte im Bereich der Modalwerte der mRNA liegt.

Eine zusätzlich wahrgenommene Möglichkeit ist die Anreicherung der gesuchten mRNA über deren Affinität zu HLA Proben. Zwei zu diesem Zeitpunkt erhältliche cDNA-Proben (Ploegh 1980 und Sood 1981, siehe Kap. 2.4), wurden nach Ultraschallbehandlung mit einer durchschnittlichen Länge von 400-600bp kovalent an aktivierte APT-Zellulose gekoppelt. In dieser Form wurden sie als Sonde zur Hybridselektion eingesetzt, bei welcher man sich die Komplementarität der Basenbindung zunutze macht. Diese Methode ermöglicht die Anreicherung einer gewünschten RNA zu 100% Reinheit.

2.2.2. Analyse der RNA Präparationen

Ehe die isolierte RNA zur Synthese von cDNA eingesetzt wurde, erfolgte eine Kontrolle der Präparationen auf Qualität und HLA Anteil.

Die Überprüfung auf physische Intaktheit, d.h. Ausschluß von RNase Aktivität, geschah durch Elektrophorese von 5-10ug zellulärer, bzw. von 1-2ug poly A^+-mRNA auf einem denaturierenden Agarosegel. Sichtbar gemacht wurde die RNA nach Anfärben mit Ethidiumbromid. Ein solches Ergebnis zeigt die

nachfolgende Abbildung.

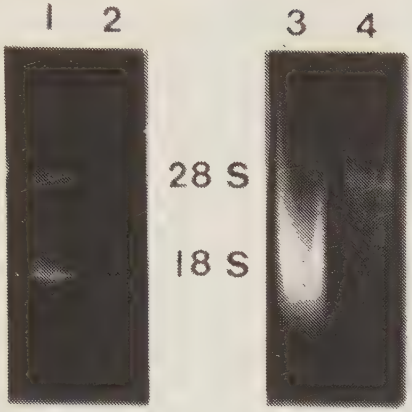


Abb. 7 Mit Ethidiumbromid angefärbte RNA nach Elektrophorese in einem 1,5% Agarosegel mit Quecksilbermethylhydroxid als denaturierendem Agens

1: zelluläre RNA (Mel-Juso)
2: zelluläre RNA (LG-2 Zelle)
3: poly A^+ mRNA der LG-2 Zelle (<1% rRNA)
4: Beispiel einer poly A^+ mRNA Präparation der LG-2 Zelle mit Restgehalt an rRNA

Eine gesteigerte Sensitivität bot die Analyse mittels Northern-Hybridisierung, welche neben qualitativen Aussagen auch eine Größenbestimmung der gesuchten mRNA-Spezies erlaubte. Dazu wurde elektrophoretisch aufgetrennte RNA auf einem Nitrozellulosefilter im Northern-Blotting Verfahren immobilisiert und mit einer radioaktiv markierten HLA cDNA Probe hybridisiert. Die gesuchten mRNA Spezies zeigten eine Größe von ca. 1,8kb.

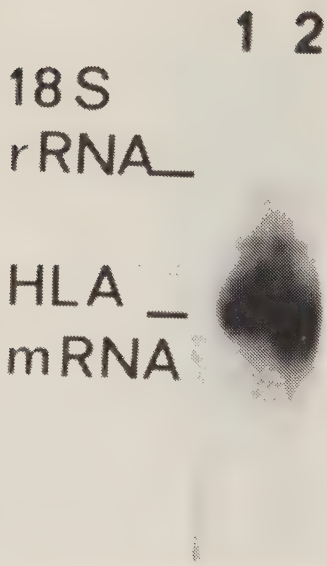


Abb 8. Northern Hybridisierung

1: 10ug zelluläre RNA (Mel-Juso)
2: 15ug zelluläre RNA (LG-2)
Als Sonde wurde Probe 1 (siehe Kapitel 2.4.1.) verwendet.
Die unterschiedliche Lage der HLA-hybridisierenden Banden könnte der jeweils applizierten Menge an RNA entsprechen.

Schließlich wurde mit Hilfe einer in vitro Translation die biologische Aktivität der verschiedenen RNA-Präparationen getestet. Zu beachten ist, daß in einem solchen Testsystem Vorläufermoleküle synthetisiert werden. Im Fall von Molekülen der Zelloberfläche kann dies von Bedeutung sein, da die immunogenen Epitope des adulten Moleküls in fast allen Fällen erst nach Prozessierung und Interaktion mit Komponenten der Membran vorliegen. Die einzige Möglichkeit, in diesem in vitro System synthetisierte schwere Ketten des HLA Moleküls zu präzipitieren war durch polyklonale Kaninchenantikörper, generiert gegen denaturiertes Antigen. Allerdings sollte in Betracht gezogen werden, daß die Effizienz der Immunpräzipitation mit diesem Antikörper äußerst gering ist Abbildung 9 zeigt die Schwäche eines solchen Signals sogar von

hybridselektionierter mRNA (etwa 100fach angereichert) und erklärt die negativen Resultate der Versuche einer Immunpräzipitation nach Translation von nicht angereicherter mRNA. Aus diesem Grund basieren sämtliche Anreicherungsangaben auf Werten aus der Literatur von 0,05-0,1% HLA spezifischer mRNA und einer geschätzten Effizienz der Immunpräzipitation von ca. 5% .

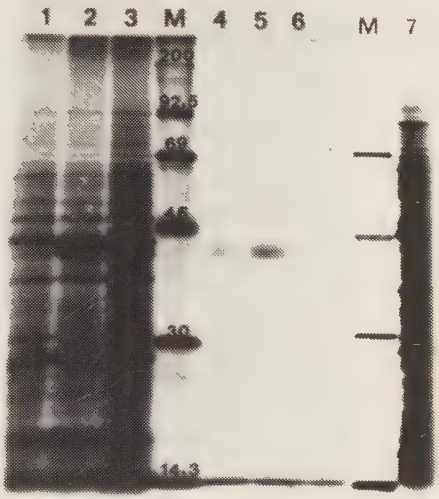


Abb. 9 In vitro Translation von mRNA nach Hybridselektion mit den nachfolgend aufgeführten Sonden:

1: pBR322 (d.h. Negativkontrolle) (30.000 cpm)
2: Probe 1 (40.000 cpm)
3: Probe 2 (50.000 cpm)
M: Markerproteine, MG x 10^{-3}
Immunpräzipitation mit der Ig-Fraktion von Kaninchenantiserum gegen denaturierte schwere HLA Ketten
4: der Translation von #3 (600.000 cpm)
5: der Translation von #2 (450.000 cpm)
6: der Translation von #1 (Negativkontrolle) (350.000 cpm)
7: Translationskontrolle mit poly A$^+$ mRNA (separates Gel)

Für die Probenbeschreibung siehe Kapitel 2.4.1.
Elektrophoretisch aufgetrennt wurden die ^{35}S-markierten Produkte auf einem 12,5% Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen.

2.2.3. Quantifizierung der HLA Klasse I mRNA in den Präparationen

Eine genauere Quantifizierung der HLA mRNA in den verschiedenen Präparationen erfolgte in einer Dot-Analyse durch Hybridisierung mit einer HLA spezifischen Probe. Dazu wurden auf Nitrozellulosefilter unterschiedliche Mengen der zu testenden RNA aufgetragen, aufgefüllt mit irrelevanter Carrier-RNA auf 3ug. Die Signale nach Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Probe konnten durch Filmschwärzung semiquantitativ und durch Messung der cpm der einzelnen Dots präzise erfaßt werden. Auf diese Art wurden die HLA spezifischen cpm/ug eingesetzter RNA bestimmt und damit konnte die Mindesteinsatzmenge für die cDNA Reaktion antizipiert werden, um eine genügend große Anzahl HLA positiver cDNA Klone zu erhalten.

2.3. Herstellung der cDNA Bank

2.3.1. Qualität und Effizienz der cDNA Reaktionen

Die Synthese von cDNA mit Hilfe der RNA-abhängigen-DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) ist mittlerweile eine etablierte molekularbiologische Methode. Die Vielzahl der Protokolle jedoch versucht Einzelaspekten gerecht zu werden - eine standardisierte Vorschrift für optimale cDNA gibt es nicht. Die durchgeführten Einzelschritte wurden speziell ausgetestet, kontrolliert und nach Bedarf variiert.

Neben den physikalisch-chemischen Bedingungen kommt der Reinheit des verwendeten Enzyms besondere Bedeutung zu: die einzige Enzympraparation, welche den gestellten Anforderungen gerecht wurde, war die von Beard, Life Science. Ein weiterer kritischer Punkt ist die gründliche Denaturierung der RNA-Vorlage, um bei sonst optimierten Bedingungen große und damit möglichst vollständige Syntheseprodukte zu erhalten. Die Verwendung von Quecksilbermethylhydroxid als denaturierendem Agens stellte sich als optimal heraus.

cDNA wurde von totaler poly A^+-, von großen- sowie hybrid-selektionierter mRNA synthetisiert. Synthese des ersten und des Komplementärstranges erfolgten mit der Reversen Transkriptase. Die Reaktionsbedingungen der drei Ansatze wurden bis auf das Verhältnis Enzym:RNA konstant gehalten, und, wie aus der nachfolgenden Tabelle ersichtlich, fielen die Ergebnisse etwas unterschiedlich aus.

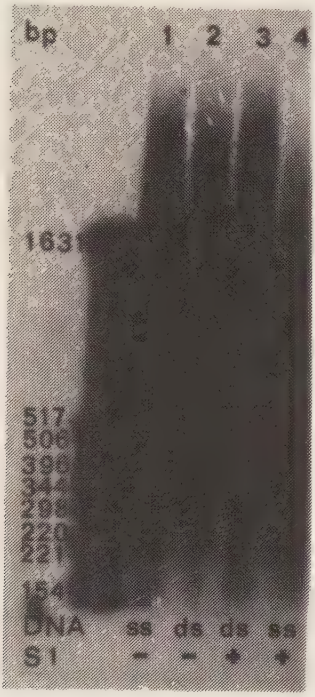
Tabelle 3 Effizienz der cDNA Reaktionen

	unfrakt.	mRNA größenfr.	hybridsel.*
Erststrangsynthese			
- eingesetzte RNA Menge	25ug	10ug	1ug
- Enzymeinheiten/ug RNA	14:1	1.6:1	10:1
- TCA fällbare cDNA	36ug	7ug	0,7ug
- S1-Nuklease° Resistenz	30%	<5%	<5%
- Größenbereich der ss cDNA		200 - 2500 bp	
- Modalwerte		1200 bp	
Zweitstrangsynthese			
- TCA fällbares Material	50ug	11ug	1.3ug
- Resistenz gegen S1-Nuklease		> 95%	
- Größenverteilung der ds cDNA		300 - > 2500 bp	
- Modalwerte		1000 bp	

* Konzentration der eingesetzten RNA nur abgeschätzt durch Spot-Tests, keine photometrische Bestimmung.
o Bedingungen für die S1-Nuklease Reaktion so titriert, daß fast ausschließlich ss cDNA abgebaut wird.

Im Fall von poly A⁺-mRNA als Ausgangsmaterial wurde durch den großen Überschuß an Reverser Transkriptase schon während der Erststrangreaktion zu einem erheblichen Teil Sekundärstrang synthetisiert. Das ist aus der Resistenz (ca. 30%) gegen S1-Nuklease Degradierung, bei Reaktionsbedingungen für ss DNA Abbau, ersichtlich. Zurückzuführen ist sie mit Sicherheit nur zu einem sehr minimalen Teil auf verfrühtes Looping des Erststranges, was zu einer vorzeitigen Initiation des Komplementärstranges führen würde, da Abb.10 zeigt, daß das denaturierte, nukleaseresistente Material große Moleküle enthält (vgl. Bahn 1 und 4 in Abb.10). Hätte dagegen Mehrfach-

initiation oder ausschließlich verfrühte Komplementärstrangbildung stattgefunden, so müßte der Großteil der Produkte ein wesentlich geringeres Molekulargewicht aufweisen.



M: Markerfragmente, pBR322 DNA mit Hinf I gespalten
1: ss cDNA
2: ds cDNA
3: ds cDNA nach S1-Nuklease Behandlung
4: ss cDNA nach S1-Nuklease Behandlung
Das hier aufgeführte Beispiel entspricht der aus unfraktionierter mRNA hergestellten cDNA (siehe Tabelle 3)

Abb. 10 Autoradiographie einer Analyse von ss und ds cDNA auf einem denaturierenden alkalischen Agarosegel

Im Fall der anderen beiden RNA Präparationen als Startmaterial wurde nur ein Teil der RNA in ss cDNA konvertiert, aber aus analogen Kontrollen (wie in Abb.10) konnte geschlossen werden, daß die Reaktions qualitativ in Ordnung war, durch das herabgesetzte Enzym/RNA Verhältnis oder eventuelle inhibitorische Schmutzreste aus der RNA Präparation (z.B. Zellulosepartikel) jedoch wohl nicht alle RNA Moleküle als Vorlagen benutzt wurden.

2.3.2. Homopolymeres Tailing der ds cDNA

Durch die selektiven Reaktionsbedingungen der S1-Nuklease wurden einzelsträngige Bereiche der cDNA Moleküle entfernt, so daß anschließend doppelsträngige Moleküle mit glatten Enden vorlagen, welche als kontrollierbares Substrat für die homopolymere Tailingreaktion dienten. Mit Hilfe des Enzyms Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) wurde hierbei in einer zeittitrierten Reaktion eine definierte Anzahl (8-16) von Desoxycytidinresten (dC) an die 3'Enden der cDNA kovalent gekoppelt. Auf die Anzahl der gebundenen dC-Reste wurde indirekt geschlossen, u.zw. nach Optimierung der Transformationseffizienz mit einem Vektor, der eine entsprechende Anzahl von dG-Positionen aufwies. Die Anzahl der vorgefundenen dC-Reste in den sequenzierten Klonen bestätigte die Richtigkeit dieser Folgerung.

2.3.3. Verpackung der cDNA, Transformation und Selektion

Doppelsträngige dC-getailte cDNA wurde in das Ampicillin-Resistenzgen des Vektors pBR322 verpackt. Dieses Plasmid, an den 3'überstehenden Enden nach Pst I Linearisierung mit je 12 Resten an Desoxyguanosin (dG) getailt, war ein komerzielles Produkt.

Während einer sogenannten Annealing-Reaktion wurde in Anwesenheit von äquimolaren Mengen an cDNA und VektorDNA stabile Konstrukte gebildet, zusammengehalten durch Wasserstoffbrücken der komplementären Basenpaare dG:dC. Eine kovalente in vitro Verknüpfung ist nicht erforderlich, sie wird später im Wirtsbakterium nachgeholt.

Als Wirtsbakterium für die Transformation diente der E.

coli Stamm C600. Die durch $CaCl_2$-Behandlung induzierte Kompetenz der Bakterien wurde zunächst mit intaktem pBR322 Vektor getestet. Zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Kompetenzinduktion erfolgte die eigentliche Transformation mit einem Teil der cDNA-pBR322 Konstrukte. Selektioniert wurde auf Tetracyclin resistente, Ampicillin sensitive Bakterien. Von den uber 50.000 erhaltenen rekombinanten Transformanten wurden etwa ein Zehntel in Mikrotiterplatten transferiert, eine Anzahl die bei weitem genug HLA positive Kandidaten zur Weiterbearbeitung enthielt. Der Transfer in Mikrotiterplatten erleichterte die Herstellung von Replikas und ganz besonders die eindeutige Identifikation und Zuordnung der gesuchten Transformanten.

2.3.4. Transformationseffizienz

Wie aus der nachfolgenden Tabelle ersichtlich, scheint die Effizienz der Transformation sehr unterschiedlich auszufallen, je nachdem ob mit Plasmid in nativem Zustand, d.h. hauptsächlich in der als "supercoiled" bezeichneten Form, oder nach vorangegangener Linearisierung transformiert wird. Geringer wird die Ausbeute, wenn rekombinante DNA vorliegt, u.zw. in Abhängigkeit von der Insertgröße.

Tabelle 4 Transformationseffizienz (Kolonien/ng DNA)

	Zeitpunkt	
	0 Std	24 Std
Kontrollen:		
- pBR322 supercoiled	1100 (optimal 1500)	4700
- pBR322 + 500bp Insert	600	
- pBR322 + 1500bp Insert	400	
- pBR322(dG) ohne Insert	< 1%.	
cDNA-Transformation		
- pBR322 + cDNA (400-1000bp)		1000
- pBR322 + cDNA (1000- 2500bp)		800

2.4. Identifizierung und Gruppierung der HLA Klasse I positiven cDNA Klone

2.4.1. Charakterisierung der verwendeten Proben

HLA Klasse I Antigene besitzen untereinander, auch zwischen den Produkten der verschiedenen Loci, eine sehr große Homologie. Daher wurden HLA positive Klone der LG-2 cDNA Bank durch Hybridisierung mit entsprechenden Proben identifiziert.

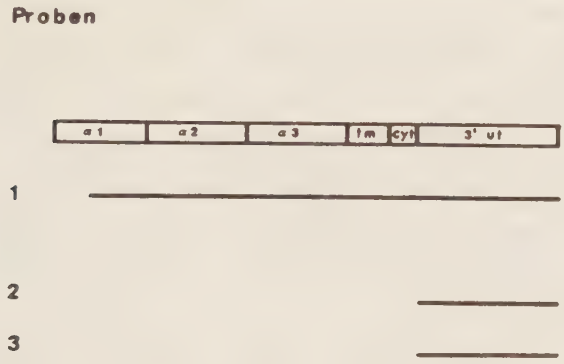


Abb 11. Proben, die zur Identifizierung von HLAhaltigen cDNA Klonen verwendet wurden

Probe 1 = pHLA-2 (Sood 1981), eine cDNA (1400bp) von HLA-B7
Probe 2 = pHLA-1.1 (Ploegh 1980, Koller 1984), von einer HLA-B8 cDNA (400bp)
Probe 3 = pHLA 2a.1 (Koller 1984), von einem HLA-A2 Gen (400bp)

Während Probe 1 den Großteil einer HLA mRNA abdeckt (Domänenbereiche α1, α2, α3, die transmembrane (tm) und zytoplasmatische Region (cyt) sowie den 3'nicht translatierten Teil (3'UT), enthalten die Proben 2 und 3 nur letzteren.

Wie aus Abbildung 11 ersichtlich, wurde die cDNA mit drei Proben auf das Vorhandensein von komplementärer DNA untersucht. Die Probe 1 ist der Klon pHLA-2 (Sood 1981, Biro 1983); er enthält eine cDNA, welche für das HLA-B7 Antigen

kodiert und das Molekül fast vollständig abdeckt. Mit Hilfe einer derartigen Probe sollten sämtliche Klone ausfindig gemacht werden, die kreuzhybridisierende Sequenzen enthalten, d.h. alle cDNAs, die für "klassische" bzw. auch "nicht-klassische" HLA Klasse I Moleküle kodieren.

Eine Gruppierung der Klone, welche mit dieser Sonde ein positives Signal ergaben, wurde durch Verwendung sogenannter 3'UT Proben ermöglicht (Probe 2 und 3 der letzten Abbildung). Sowohl im Maus- (Kress 1983) als auch im humanen System (Koller 1984) konnte gezeigt werden, daß die nicht translatierte 3'Region (3'UT) der Histokompatibilitäts mRNAs bzw. Gene eine Locusspezifität aufweist. Direkt gezeigt wurde diese erst an begrenztem Material und nur für die HLA-A sowie -B Transkripte, während für HLA-C noch keine derartige Probe beschrieben wurde. Der Unterschied in diesem Bereich zwischen den Transkripten der verschiedenen Loci ist nicht besonders groß (z.B. HLA-A/A 2% versus HLA-A/C 14% bzw. HLA-A/B 12% usw., siehe Diskussion dieser Arbeit), aber signifikant genug, um durch ausgewählte Hybridisierungsbedingungen mit Proben aus dieser Region einen guten Hinweis auf die Locuszugehörigkeit erhalten zu können. Probe 2 stellt den Klon pHLA-1.1 dar (Koller 1984), und wurde durch geeignete Restriktionsschnitte aus einer HLA-B8 cDNA (Ploegh 1980) isoliert, wahrend Probe 3 , pHLA a2.1 (Koller 1984) von einem genomischen HLA-A2 Klon stammt. So sollten die Proben 2 und 3 die Produkte des HLA-A bzw. HLA-B Locus identifizieren.

Die Spezifität der Proben wurde in einem genomischen Southern getestet, bei dem Eco RI gespaltene chromosomale DNA der LG-2 Zellinie auf Nitrozellulose fixiert war. Da in den bislang charakterisierten HLA Genen keine solchen Schnitt-

stellen vorkommen, sollten die hybridisierenden Banden ganze Gene enthalten.

Abb. 12 Spezifität der Proben 1 und 2, getestet in einem genomischen Southern

Auf der Nitrozellulose fixiert waren jeweils 10ug Eco RI gespaltene zelluläre DNA der LG-2 Zelle.
1: Signale nach Hybridisierung mit ^{32}P-markierter Probe 1
2: Signal nach Hybridisierung mit ^{32}P-markierter Probe 2

Deutlich unterscheiden sich die beiden getesteten Proben. Die Vielzahl der Signale mit Sonde 1 war zu erwarten, und entspricht den geschätzten 20-30 HLA Klasse I Genen, während nur eine Bande mit Probe 2 hybridisiert, welche wohl dem HLA-B Locus zugeornet werden kann.

2.4.2. Identifizierung von HLA Klasse I positiven cDNA Klonen

Mit den beschriebenen Sonden wurden Replikas der cDNA Bank in Kolonienhybridisierungen analysiert. Ein Beispiel der Positivwertung zeigt die folgende Abbildung:

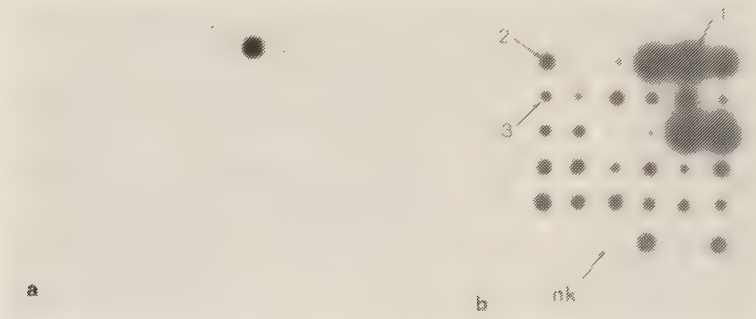


Abb. 13 Signalwertung der Kolonienhybridisierung

a.) Beispiel eines positiven Signals beim ersten Screenen der cDNA Bank mit Probe 1
b.) Vergleichende Signalwertung bei positiven Klonen - hier nach Hybridisierung mit Probe 2: stark (1), mittel (2), schwach (3); negative Kontrolle (nk) war pBR322.

Kolonien, die mit Probe 1 schwache bis starke Signale (d.h. sämtliche Signale über einem unspezifischen Hintergrund) zeigten wurden als HLA positiv gewertet, während die Diskriminierung in Produkte des HLA-A bzw. HLA-B Locus nur aufgrund sehr starker Signale mit den Proben 2 oder 3 im Anschluß an das erste Screening erstellt wurde. Eine zahlenmäßige Erfassung der erhaltenen Daten zeigt die anschließende Tabelle.

Tabelle 5 Häufigkeit von HLA positiven Klonen in der cDNA der verschiedenen RNA Praparationen

	positive Signale		
	Probe 1 (HLA Klasse I)	Probe 2 (HLA-B)	Probe 3 (HLA-A)
1. cDNA von poly A⁺ mRNA (4400 getestete Klone)	40	8	12
2. cDNA von größenselektionierter RNA (250 getestete Klone)	2	1	0
3. cDNA von hybridselektionierter RNA (270 getestete Klone)	69	19	2

Der etwas höher als erwartet (0,05-0,1% der mRNA, siehe Ploegh 1980) ausgefallene Anteil von HLA positiven Klonen der gesamten poly A⁺-mRNA kann durch die Erfassung von HLA Klasse I Klonen mit nur partieller Homologie erklärt werden. Zusätzlich kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, daß die Zellinie LG-2 eine höhere Expression der Allele zeigt oder daß bestimmte Alleltypen eine häufigere Transkription erfahren als andere. Die Größenselektion führte zu einer 5-10fachen, die Hybridselektion zu einer etwa 100fachen Anreicherung der HLA positiven Klone. Da die Sequenzierung eines Klons aus der zuletzt genanntenn Gruppe zeigte, daß trotz aller Vorsicht auch cDNA der zur Hybridselektion benutzten Sonde (pHLA-2, Probe 1) rekloniert wurde, konzentrierte sich die weitere Arbeit auf Vertreter der ersten beiden Gruppen. Trotzalledem bleibt diese Technik für das Klonieren von sehr seltenen mRNAs sinnvoll, solange die Gefahr der Reklonierung ausgeschlossen werden kann.

Die Verifizierung der differenziellen Signale und ihrer Wertung aus den Kolonienhybridisierungen geschah durch DNA-Dot - Hybridisierungen ausgewählter Kandidaten. Die Signal-

intensität dieser Hybridisierungen wurde korreliert mit der Länge der Klone (siehe anschließendes Kapitel) und ermöglichte eine Einengung der rekombinanten Transformanten von Interesse für eine weitere Analyse.

2.5. Charakterisierung der HLA Klasse I cDNAs der LG-2 Zelle

2.5.1. Gruppierung in HLA-A und HLA-B Klone aufgrund von Restriktionskarten

Die erste Einteilung der HLA positiven Klone aufgrund der Hybridisierungssignale mit locusspezifischen Proben konnte durch Erstellung von Restriktionskarten und eine entsprechende Gruppierung dieser überprüft werden. Dazu wurde von Kandidaten DNA isoliert - Auswahlkriterien waren Signalintensität mit Probe 1 sowie Länge des Inserts - , diese mit Restriktionsenzymen einzeln oder sequenziell gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Durch Mehrfachblotting wurden identische Filter angelegt und mit Teilproben hybridisiert. Als Sonden dienten isolierte Pvu II Fragmente der schon verwendeten Probe 1 (pHLA-2) sowie die intakte Probe 3. Abbildung 14 zeigt die Bereiche einer HLA mRNA, welche diesen fragmentierten Proben entsprechen.

Probe 2 (pHLA-1, in Abb.11 dargestellt) konnte hierbei entbehrt werden, da das Fragment 1.3 des Klons pHLA-2 gleichwertig ist.

Durch derartige Analysen kristallisierten sich zwei Muster von Restriktionskarten heraus, die mit den jeweils stark positiven Signalen der HLA-A und HLA-B spezifischen Proben korrelierten, und daher als homogene HLA-A bzw. HLA-B Gruppen angesehen werden können (Abb. 15).

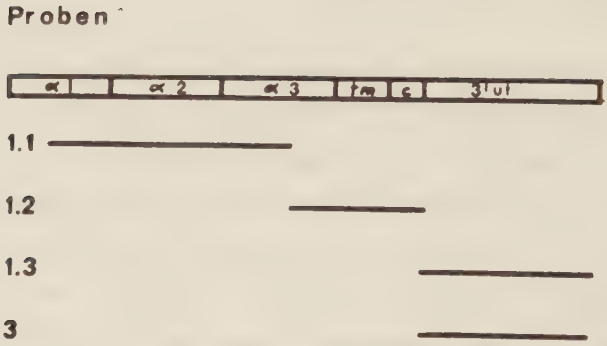


Abb. 14 Fragmentierte Proben zur Analyse von Orientierung und Länge der HLA cDNA Klone

Proben 1.1, 1.2 und 1.3: die Fragmente der Probe 1 (pHLA-2, siehe Abb. 11) nach Pvu II Restriktion
Probe 3: ist Probe 3 aus Abb. 11 (pHLA-a2.1)

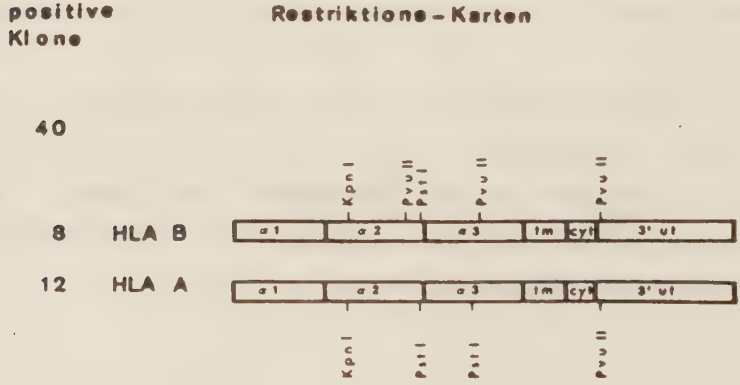


Abb. 15 Grobe Restriktionskarten, aufgrund derer die Transkripte des HLA-A und -B Locus der LG-2 Zelle unterschieden werden können

Diese Restriktionskarten stellen Ergebnisse dar, welche durch Zusammenfassung mehrerer, uberlappender cDNA Klone zustande gekommen sind, da in keinem untersuchten Fall ein Klon komplette Länge aufwies.

Die Mehrheit der cDNA Klone läßt sich allerdings nicht in diese Gruppierung einordnen, und enthält wahrscheinlich "nicht-klassische" HLA Klasse I Sequenzen, deren weitere Untersuchung sehr interessant sein konnte, aber kein Thema der vorliegenden Arbeit ist.

Ein Klon war auffällig. Von den Restriktionsschnitten her verhielt er sich wie ein HLA-B Vertreter, zeigte mit der HLA-B spezifischen Probe jedoch kein intensives Signal, trotz vorhandener, der Sonde entprechender Region. Dieser Klon, pC1, wurde ebenfalls weiter analysiert und ist in Kapitel 2.5.2. beschrieben.

2.5.2. Sequenzen repräsentativer Klone

Die Sequenzbestimmung erfolgte mit der Didesoxy-Methode nach Sanger (Sanger 1977). Dazu wurde die in pBR322 klonierte cDNA durch geeignete Restriktionsenzyme in Fragmente von 400-600bp gespalten und in M13 Vektoren umkloniert. Von Vorteil war hierbei die Möglichkeit des forcierten Klonierens (Messing 1982) mit Hilfe von Vektoren, die so konstruiert sind, daß sie definierte Linkersequenzen im gegenläufigen Sinn enthalten und damit Insertion in einer vorher bestimmbaren Orientierung erlauben. So können von einem DNA Fragment, welches nach

---

Abb. 16 Strategie zur Sequenzierung

Darstellung der M13 Subklone und der Sequenzierungsrichtung
MG: dieses Fragment wurde zusätzlich mit dem Protokoll nach Maxam und Gilbert (1977) überprüft.

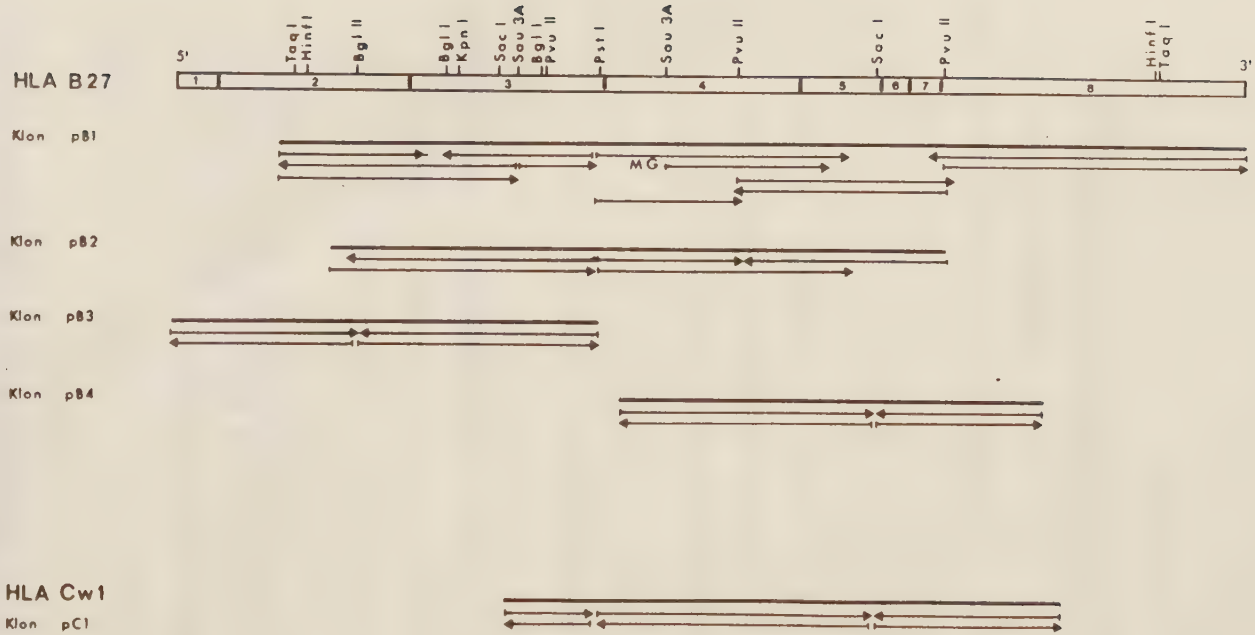

HLA B27
5'
3'
Taq I
Hinf I
Bgl II
Bgl I
Kpn I
Soc I
Sau 3A
Bgl I
Pvu II
Pst I
Sau 3A
Pvu II
Soc I
Pvu II
Hinf I
Taq I
1
2
3
4
5
6
7
8
Klon pB1
MG
Klon pB2
Klon pB3
Klon pB4
HLA Cw1
Klon pC1

Abb. 16

Restriktion ungleiche Enden aufweist, durch gleichzeitiges Subklonieren in das Vektorenpaar M13 mp10 und M13 mp11 Strang und Gegenstrang sequenziert werden. Nur in einem Fall wurde vom Protokoll nach Maxam & Gilbert (Maxam 1977) Gebrauch gemacht, als Sequenzen mit der Didesoxy-Methode, wahrscheinlich aufgrund von Sekundärstrukturen, nicht eindeutig lesbar waren.

Der endgültige Beweis, daß die Einteilung in HLA-A und HLA-B Gruppen entsprechend Hybridisierungssignalen und Restriktionskarten tatsächlich stimmt, wurde durch die Sequenzierung von Kandidaten der jeweiligen Kategorien erbracht.

Die Sequenzbestimmung von Klon pA5, der 900bp lang ist und aus der als HLA-A definierten Gruppe stammt, zeigt im vertretenen kodierenden Anteil (Mitte der dritten Domäne bis zum carboxyterminalen Ende) und in der kompletten 3'UT Region Identität mit den Sequenzen des erst kürzlich publizierten HLA-A2 Gens (Koller 1985) und den schon schon länger bekannten Proteindaten (Orr 1979). Somit ist seine Zuordnung als Produkt des HLA-A2 Locus der LG-2 Zelle eindeutig. Da die Ausarbeitung der HLA-A2 Sequenzen nur zur Kontrolle diente ohne neue Daten zu erstellen, werden diese Ergebnisse nicht extra aufgefuhrt und auch nicht weiter diskutiert.

Die Sequenzermittlung weiterer cDNA Klone der pB-Serie und des Klons pC1 kann der Abbildung 16 entnommen werden.

Die Sequenzbestimmung des schon erwähnten Klons pC1, der zwar Restriktionsahnlichkeit mit der HLA-B Gruppe aufwies, aber seiner Hybridisierungssignale wegen keine eindeutige Zuordnung zuließ, ermöglichte aufgrund von sehr klarer Homologie zu der einzigen bekannten HLA-C Sequenz (Sodoyer 1984) eine Identifizierung dieses Klons als Produkt des HLA-

Cw1 Locus der LG-2 Zelle. Der cDNA Klon ist inkomplett: er enthält Sequenzen, die bei nur einem offenen Leserahmen für ein HLA Molekül ab Aminosaureposition 138 (d.h. Start in der α2 Domäne) bis zum Ende der zytoplasmatischen Region kodieren und 160 Nukleotide der 3'UT Region (siehe Abb.17.)

Wie aus Abbildung 16 ersichtlich, wurden mehrere Klone der pB-Serie sequenziert; diese Klone kamen aus der Gruppe, die aufgrund der Hybridisierungssignale mit den Locus diskriminierenden Sonden und aufgrund ihrer Restriktionsmuster als HLA-B definiert worden war. Die Klone enthalten überlappende Sequenzen und sind als Produkt nur eines Gens erkennbar.

Abb. 17 Partielle cDNA Sequenz von HLA-Cw1 (Klon pC1)

Der kodierende Bereich ist in Tripletts, der nicht translatierte Teil in Zehnergruppen wiedergegeben. Die Numerierung der Tripletts bezieht sich auf die Aminosäurepositionen des HLA Antigens.

```
        140                                     150
ACG GCG GCT CAG ATC ACC CAG CGC AAG TGG GAG GCG GCC CGT GTG GCG GAG CAG
                160                                     170
CTG AGA GCC TAC CTG GAG GGC GAG TGC GTG GAG TGG CTC CGC AGA TAC CTG GAG
                        180                             Exon5   190
AAC GGG AAG GAG ACG CTG CAG CGC GCG GAA CAC CCA AAG ACA CAC GTG ACC CAC
                                        200
CAT CCC GTC TCT GAC CAT GAG GCC ACC CTG AGG TGC TGG GCC CTG GGC TTC TAC
210                                     220
CCT GCG GAG ATC ACA CTG ACC TGG CAG TGG GAT GGG GAG GAC CAA ACT CAG GAC
        230                                     240
ACC GAG CTT GTG GAG ACC AGG CCA GCA GGA GAT GGA ACC TTC CAG AAG TGG GCA
                250                                     260
GCT GTG ATG GTG CCT TCT GGA GAA GAG CAG AGA TAC ACG TGC CAT GTG CAG CAC
                        270             Exon5                   280
GAG GGG CTG CCG GAG CCC CTC ACC CTG AGA TGG GAG CCG TCT TCC CAG CCC ACC
                                        290
ATC CCC ATC GTG GGC ATC GTT GCT GGC CTG GCT GTC CTG GCT GTC CTA GCT GTC
    300                                     310             Exon6
CTA GGA GCT GTG GTG GCT GTT GTG ATG TGT AGG AGG AAG AGC TCA GGT GGA AAA
            320                     Exon7           330
GGA GGG AGC TGC TCT CAG GCT GCG TCC AGC AAC AGT GCC CAG GGC TCT GAT GAG
                        340  Exon8+
TCT CTC ATC GCT TGT AAA GCC TGA

3'UT
GACAGCTGCC  TGTGTGGGAC  TGAGATGCAG  GATTTCTTCA  CACCTCTCCT  TTGTGACTTC
AAGAGCCTCT  GGCATCTCTT  TCTGCAAAGG  CATCTGAATG  TGTCTGCGTT  CCTGTTAGCA
TAATGTGAGG  AGGTGGAGAG  ACAGCCCACC  CCCGTGTCCA
```

2.6. cDNA Sequenz des HLA-B27 Antigens

Die Klone pB1-pB4 der pB-Serie enthalten Sequenzen, welche nur einen möglichen offenen Leserahmen haben und sehr starke Homologie zu der HLA-B7 Nukleotidsequenz (Biro 1983, Biro 1985). aufweisen. Basierend auf dem Phanotyp der autozygoten Zellinie LG-2 kann gefolgert werden, daß sie das HLA-B27 Antigen spezifizieren.

Klon pB1 (1372bp) und der überlappende Klon pB3 (605bp) beinhalten die für ein adultes HLA Molekül kodierenden Regionen und den 3'untranslatierten Teil der HLA-B27 mRNA (siehe Abb. 16). Die allgemeinen Charakteristika dieses Transkripts sind typisch denen einer mRNA für eine HLA Klasse I schwere Kette. Klon pB3 enthält Sequenzen, die für 21 Aminosäuren eines Signalpeptids kodieren; es fehlt allerdings das ATG Startkodon, das in den bekannten genomischen HLA Sequenzen (Koller 1985, N'Guyen 1985, Sodoyer 1984, Strachan 1984, Biro 1985) wenige Basenpaare entfernt vorkommt, da im allgemeinen die Leadersequenz dieser Molekule aus 24 Aminosäuren zusammengesetzt ist. Unerwartet war der Fund eines TGA Codons im Klon pB1 am Ende des vierten Exons (Triplett 274). Zwei weitere Klone, pB2 und pB4, zeigten jedoch bei sonst identischen Sequenzen an dieser Stelle das Codon TGG. Zusatzlich konnte keinerlei Evidenz für die Expression eines gekürzten (ca. 35kD) HLA Polypeptids erbracht werden, weder durch in vitro Translation von hybridselektionierter mRNA (siehe Abb.9 in Kapitel 2.2.2), noch durch Immunpräzipitation von metabolisch markierten Zellprodukten (siehe Abb.5 in Kapitel 2.1). Zieht man in Betracht, daß beide Strange der rekombinanten DNA mit der Reversen Transkriptase synthetisiert worden waren, einem Enzym, welches höhere Fehlerquoten als andere Polymerasen

aufweist, so kann dieses TGA Codon als Synthesefehler im Klon pB1 angesehen werden. Das authentische Terminationskodon liegt bei den Klonen pB2, pB4 wie auch pB1 am Ende von Exon 7, an der gleichen Position wie in der HLA-B7 Nukleotidsequenz (Biro 1983, 1985).

```
Exon1                                                   -10
ACG GCG CCC GAG ACC CTC CTC CTG CTG CTC TGG GGG GCA GTG GCC CTG ACC GAG
                Exon2                                   10
ACC TGG GCT GGC TCC CAC TCC ATG AGG TAT TTC CAC ACC TCC GTG TCC CGG CCC
                20                                              30
GGC CGC GGG GAG CCC CGC TTC ATC ACC GTG GGC TAC GTG GAC GAC ACG CTG TTC
                        40                                              50
GTG AGG TTC GAC AGC GAC GCC GCG AGT CCG AGA GAG GAG CCG CGG GCG CCG TGG
                                60
ATA GAG CAG GAG GGG CCG GAG TAT TGG GAC CGG GAG ACA CAG ATC TGC AAG GCC
 70                                     80
AAG GCA CAG ACT GAC CGA GAG GAC CTG CGG ACC CTG CTC CGC TAC TAC AAC CAG
         90  Exon3                                  100
AGC GAG GCC GGG TCT CAC ACC CTC CAG AAT ATG TAT GGC TGC GAC GTG GGG CCG
                110                                             120
GAC GGG CGC CTC CTC CGC GGG TAC CAC CAG GAC GCC TAC GAC GGC AAG GAT TAC
                        130                                             140
ATC GCC CTG AAC GAG GAC CTG AGC TCC TGG ACC GCC GCG GAC ACG GCG GCT CAG
                                150
ATC ACC CAG CGC AAG TGG GAG GCG GCC CGT GTG GCG GAG CAG CTG AGA GCC TAC
160                                     170
CTG GAG GGC GAG TGC GTG GAG TGG CTC CGC AGA TAC CTG GAG AAC GGG AAG GAG
         180         Exon4                          190
ACG CTG CAG CGC GTG GAC CCC CCA AAG ACA CAC GTG ACC CAC CAC CCC ATC TCT
                200                                             210
GAC CAT GAG GCC ACC CTG AGG TGC TGG GCC CTG GGC TTC TAC CCT GCG GAG ATC
                        220                                             230
ACA CTG ACC TGG CAG CGG GAT GGC GAG GAC CAA ACT CAG GAC ACT GAG CTT GTG
                                240
GAG ACC AGA CCA GCA GGA GAT AGA ACC TTC CAG AAG TGG GCA GCT GTG GTG GTG
250                                     260
CCT TCT GGA GAA GAG CAG AGA TAC ACA TGC CAT GTA CAG CAT GAG GGG CTG CCG
         270                Exon5                       280
AAG CCC CTC ACC CTG AGA TGG GAG CCG TCT TCC CAG TCC ACC GTC CCC ATC GTG
                290                                             300
GGC ATT GTT GCT GGC CTG GCT GTC CTA GCA GTT GTG GTC ATC GGA GCT GTG GTC
                        310                 Exon6                   320
GCT GCT GTG ATG TGT AGG AGG AAG AGC TCA GGT GGA AAA GGA GGG AGC TAC TCT
                Exon7                   330
CAG GCT GCG TGC AGC GAC AGT GCC CAG GGC TCT GAT GTG TCT CTC ACA GCT TGA

AAA G

3'UT
CCTGAGACAG CTGTCTTGTG AGGGACTGAG ATGCAGGATT TCTTCACGCC TCCCCTTTGT
GACTTCAAGA GCCTCTGGCA TCTCTTTCTG CAAAGGCACC TGAATGTGTC TGCGTCCCTG
TTAGCATAAT GTGAGGAGGT GGAGAGACCA GCCCACCCCC GTGTCCACTG TGACCCCTGT
TCCCATGCTG ACCTGTGTTT CCTCCCCAGT CATCTTTCCT GTTCCAGAGA GGTGGGGCTG
GATGTCTCCA TCTCTGTCTC AACTTTATGT GCACTGAGCT GCAACTTCTT ACTTCCCTAC
TGAAAATAAG AATCGAATAT AAATTTGTTT TCTCAAATAT TTGCTATGAG AGGTTGATGG
ATTAATTAAA TAAGTCAATT CCTGGAATTT GAGAGAGCAA ATAAAGACCT GAGAACCTTC
CAGAAAAAAA AAAAAAAAAA
```

Abb. 18 cDNA Sequenz von HLA-B27

Der kodierende Anteil ist in Tripletts angegeben, die 3'UT Region in Zehnerblocks. Die Numerierung der Tripletts bezieht sich auf die Aminosäurepositionen im Protein.

3. DISKUSSION

3.1. Nukleotidvergleich der HLA-B27 Sequenz mit bekannten HLA Sequenzen

Die von den beiden überlappenden cDNA Klonen pB1 und pB3 spezifizierte Sequenz einer Länge von 1524 Basenpaaren stammt zweifellos, mit nur einem offenen Leseraster, von einer HLA Klasse I mRNA. Sie läßt sich ohne Schwierigkeiten mit den Exons bisher bekannter HLA Sequenzen vergleichen (siehe Abb. 19).

Exon 1, verantwortlich für das Leader- oder Signalpeptid, zeigt eine gewisse Codonvariabilität, durch die jedoch der notwendige hydrophobe Charakter dieses Segments nicht verloren geht. Die Nukleotidaustausche in Exon 2 und Exon 3 (welche für die beiden N-terminalen Domänen α1 und α2 kodieren) sind effektive Austausche, d.h. sie haben fast durchwegs Aminosäuresubstitutionen zur Folge; gleiches trifft auch für die anderen HLA Sequenzen zu und ist das Äquivalent des extremen Polymorphismus dieser Molekülklasse. Die Häufung von "stillen" (oder "stummen") Nukleotidaustauschen in Exon 4, verglichen mit den vorangegangenen Exons, ist Ausdruck der, für die Funktion der HLA Moleküle notwendigen Konservierung dieses Bereiches - α3 ist die Domäne, die hauptsächlich mit β_2-

---

Abb. 19 Bekannte HLA-Nukleotidsequenzen im Vergleich

HLA-A3 (Strachan 1984), HLA-A2 (Koller 1985), HLA-A28 (Arnot 1984), HLA-Aw24 (N'Guyen 1985), HLA-B7 (Biro 1985), HLA-Cw3 (Sodoyer 1984), Pseudogen 12.4 (Malissen 1982)
Kodierende Bereiche sind in Tripletts dargestellt, die 3'UT-Region ist in 10er Gruppen aufgeführt. Leerstellen, eingefügt um die Homologie zu maximieren, sind durch Doppelpunkt gekennzeichnet. Das Consensus-Polyadenylierungssignal AATAAA ist unterstrichen. Ein locusspezifischer Sequenzbereich im transmembranen Segment (Exon 5) ist durch Einkastelung hervorgehoben.

```
     Exon 1                                  -20                                     -10
A3   ATG GCT CGT GGA GAC CAG GCC GTC ATG GCG CCC CGA ACC CTC CTC CTG CTA CTC TCG GGG GCC CTG GCC CTG ACC CAG ACC TGG GCG G
A2   --- ::: ::: ::: ::: ::: --- --- --- --- --- --- --- --- G-- --- --- --- --- --- --T --- --- --- --- --- --- --- --- -
Au24 --- ::: ::: ::: ::: ::: --- --- --- -G- --- --- --- --- G-- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --A -

B27                                     -C- --- --- GAG --- --- --- --- --G --- -G- --- --A G-- --- --- --- G-- --- --- --T -
B7   --- ::: ::: ::: ::: ::: CTG --- --- --- --- --- --- G-- --- --- --G --- --- -C- --- --- --- --- --- G-- --- --- --C -

Cu3  --- ::: ::: ::: ::: ::: CGG --- --- --- --- --G --- --- A-- --- --G --- --- --A --- --- --- --- --- G-- --- --- --C -

12.4 --- ::: ::: ::: ::: ::: -TG C-- --- --- --- --- --- --- --- --- --G --- --A --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -


     Exon 2                                  10                                      20                                      30
A3   GC TCC CAC TCC ATG AGG TAT TTC TTC ACA TCC GTG TCC CGG CCC GGC CGC GGG GAG CCC CGC TTC ATC GCC GTG GGC TAC GTG GAC GAC ACG
A2   -- --T --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --A --- --- --- --- --- --- ---
Au24 -- --- --- --- --- --- --- --- -C- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

B27  -- --- --- --- --- --- --- --- CA- --C --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- A-- --- --- --- --- --- ---
B7   -- --- --- --- --- --- --- --- -A- --C --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- T-A --- --- --- --- --- --- --C

Cu3  -- --- --- --- --- --- --- --- -G- --C G-T --- --- --- --- --A --- --- --- --- -A- --- --- --- --- --- --- --- ---

12.4 -T --- --- --- --- --- --- --- -A- --C A-- A-- --- --- --- --- GC- --- --- --- --- --- --- T-- --C --- --- --- --- --T ---


                                        40                                      50                                      60
A3   CAG TTC GTG CGG TTC GAC AGC GAC GCC GCG AGC CAG AGG ATG GAG CCG CGG GCG CCG TGG ATA GAG CAG GAG GGG CCG GAG TAT TGG GAC
A2   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --T --- --- --- --- ---
Au24 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

B27  -T- --- --- A-- --- --- --- --- --- --- --T -C- --A GA- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
B7   --- --- --- A-- --- --- --- --- --- --- --T -C- --A GA- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

Cu3  --- --- --- --- --- --- --- --- -A- -A- --T -C- --A GG- --- --- A-- --- --- --- G-G --- -G- A-- --- --- --- --- ---

12.4 --- --- --- --- --- --- --- --- -A- --- --T -C- --A GA- --- --- --- --- --- --- --G --- -G- --- --- --A A-- --- --- ---


                                        70                                      80                                      90
A3   CAG GAG ACA CGG AAT GTG AAG GCC CAG TCA CAG ACT GAC CGA GTG GAC CTG GGG ACC CTG CGC GGC TAC TAC AAC CAG AGC GAG GCC G
A2   GG- --- --- --- --A --- --- --- --C --- --- --- C-- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
Au24 G-- --- --- G-- --A --- --- --- --C --- --- --- --- --- -A- A-G --- C-- -T- GC- -T- C-- --- --- --- --- --- --- ---

B27  -G- --- --- -A- -TC TGC --- --- A-- G-- --- --- --- --- -A- --- --- C-- --- --- -T- C-- --- --- --- --- --- --- ---
B7   -G- A-C --- -A- -TC TAC --- --- --- G-- --- --- --- --- -A- AG- --- C-- -A- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

Cu3  -G- --- --- -A- --G TAC --- C-- --- G-- --- --- --- --- --- AG- --- C-- -A- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

12.4 -G- A-C --- -A- -TC TGC --- --- --- G-- --- --- --A --- -A- A-- --- C-- -T- GC- -T- C-- --- --- --- --- --- --- -G- -


     Exon 3                                  100                                     110                                     120
A3   GT TCT CAC ACC ATC CAG ATA ATG TAT GGC TGC GAC GTG GGG TCG GAC GGG CGC TTC CTC CGC GGG TAC CGG CAG GAC GCC TAC GAC GGC AAG
A2   -- --- --- --- G-- --- -GG --- --- --- --- --- --- --- --- --- T-- --- --- --- --- --- --- -AC --- --- --- --- --- ---
A28                                                                     --- --- --- --- --- --- --- --C --- --- --- --- --- ---
Au24 -- --- --- --- C-- --- --G --- -T- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -AC --- T-- --- --- --- --- ---

B27  -G --- --- --- C-- --- -AT --- --- --- --- --- --- C-- --- --- --- C-- --- --- --- --- -AC --- --- --- --- --- --- ---
B7   -G --- --- --- C-- --- -GC --- --C --- --- --- --- --- C-- --- --- --- C-- --- --- --- C-T GAC --- T-- --- --- --- --- ---

Cu3  -G --- --- --- -T- --- --- -GG --- --- --- --- --- --- --- C-C --- --- --- --- C-- --- --- --- --T GAC --- C-- --- --- --- --- ---

12.4 -- --- --- --- --G --- G-G --- --- --- --- --- --- --- C-C --- --- --- -CT --- --- --- --- --T GAA --- C-- --- --- --- --- ---


                                        130                                     140                                     150
A3   GAT TAC ATC GCC CTG AAC GAG GAC CTG CGC TCT TGG ACC GCG GCG GAC ATG GCG GCT CAG ATC ACC AAG CGC AAG TGG GAG GCG GCC CAT
A2   --- --- --- --- --- --A --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --A --- --- -C- --- -A- --- --- --- --- ---
A28  --- --- --- --- --- --A --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --A --- --- -C- --- --- -A- --- --- --- --- --- ---
Au24 --- --- --- --- --- --A --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

B27  --- --- --- --- --- --- --- --- --- A-- --C --- --- --C --- --- -C- --- --- --- --- --- C-- --- --- --- --- --- -G-
B7   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --C --- --- --C --- --- -C- --- --- --- -- --- C-- --- --- --- --- --- -G-

Cu3  --- --- --- --- --- --- --- --T --- --- --C --- --- --C --- A-- -C- --- --- --- --- C-- --- --- --- --- --- -G-
Cu1                                                                     -C- --- --- --- --- C-- --- --- --- --- --- -G-

12.4 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --C --- --- --- --- --- --A --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -G-


                                        160                                     170                                     180
A3   GAG GCG GAG CAG TTG AGA GCC TAC CTG GAT GGC ACG TGC GTG GAG TGG CTC CGC AGA TAC CTG GAG AAC GGG AAG GAG ACG CTG CAG CGC ACG G
A2   -T- --- --- --- --- --- --- --- --- --G --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
A28  -T- --- --- --- -G- --- --- --- --- --G --T --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
Au24 -T- --- --- --- CA- --- --- --- --- --G --- --- --- --- --C G-- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- G-- -

B27  -T- --- --- --- C-- --- --- --- --- --G --- GA- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- GT- -
B7   --- --- --- --- CG- --- --- --- --- --G --- GA- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --C -A- --- G-- -G-T -

Cu3  --- --- --- --- C-- --- --- --- --- T-- --G --- CT- --- --- --- --- --- --- --- --- A-- --T --- --- --- --- --- G-- -
Cu1  -T- --- --- --- C-- --- --- --- --- --G --- GA- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- G-- -

12.4 CG- --- --- --- CG- --- -T- --- T-- --G --- GA- -T- --- --- --- --- --- --- --- T-- --- --- --- --- --- --- --- G-- -


     Exon 4                             190                                     200                                     210
A3   AC CCC CCC AAG ACA CAT ATG ACC CAC CAC CCC ATC TCT GAC CAT GAG GCC ACC CTG AGG TGC TGG GCC CTG GGC TTC TAC CCT GCG GAG ATC
A2   -- G-- --- --A --G --- --- --T --- --- G-T G-- --- --- --- --A -- --- --- --- --- --- --- A-- --- --- --- --- --- ---
A28  -- G-- --- -A --G --- --- --T --- --- G-T G-- --- --- --- --A --- --- --- --- --- --- A-- --- --- --- --- --- ---
Au24 -- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --T --- --A --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

B27  -- --- --A --- --- --C G-- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
B7   -- --- --A --- --- --C G-- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --T --- --- --- --- --- --- ---

Cu3  -A -A- --A --- --- --C G-- --- --- --T --- G-- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
Cu1  -A -A- --A --- --- --C G-- --- --- --T --- G-- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

12.4 -- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---


                                        220                                     230                                     240
A3   ACA CTG ACC TGG CAG CGG GAT GGG GAG GAC CAG ACC CAG GAC ACG GAG CTC GTG GAG ACC AGG CCT GCA GGG GAT GGA ACC TTC CAG AAG
A2   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
A28  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --A --- A-- --- C-- --- --- ---
Au24 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --T --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

B27  --- --- --- --- --- --- --- --C --- --- --A --T --- --- --T --- --- --T --- --- --- --A --A --- --A --- A-- --- ---
B7   --- --- --- --- --- --- --- --C --- --- --A --T --- --- --T --- --T --- --- --- --A --A --- --A --- A-- --- --- ---

Cu3  --- --- --- --- --- T-- --- --- --- --- --A --T --- --- --T --- --T --- --- --- --- --A --- --A --- --- --- --- ---
Cu1  --- --- --- --- --- T-- --- --- --- --- --A --T --- --- --T --- --T --- --- --- --- --A --- --A --- --- --- --- ---

12.4 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
```

```
                                                  250                                                 260                                                 270
A3      TGG GCG GCT GTG GTG GTG CCT TCT GGA GAG GAG CAG AGA TAC ACC TGC CAT GTG CAG CAT GAG GGT CTG CCC AAG CCC CTC ACC CTG AGA TGG G
A2      --- --- --- --- --- --- --- --- --- C-- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- T-- --- --- --- --- --- --- --- --- -
A28     --- -T- --- --- --- --- --- --- --- C-- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- T-- --- --- --- --- --- --- --- --- -
Au24    --- --A --- --- --- --A --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -

B27     --- --A --- --- --- --- --- --- --- --A --- --- --- --- --A --- --- --A --- --- --- --G --- --G --- --- --- --- --- --- -
B7      --- --A --- --- --- --- --- --- --- --A --- --- --- --- --A --- --- --A --- --- --- --G --- --G --- --- --- --- --- --- -

Cu3     --- --A --- --- --- --- --- --- --- --A --- --- --- --- --G --- --- --- --- --- --C --- --G --- --G G-- --- --- --- --- -
Cu1     --- --A --- --- A-- --- --- --- --- --A --- --- --- --- --G --- --- --- --- --- --C --- --G --- --G G-- --- --- --- --- -

12.4    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- G-- --- --- --- --- --- -

        Exon 5                  280                                                 290                                                 300
A3      AG CTG TCT TCC CAG CCC ACC ATC CCC ATC GTG GGC ATC ATT GCT GGC CTG GTT CTC CTT GGA GCT ::: GTG ATC ACT GGA GCT GTG GTC GCT
A2      -- -C- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ::: --- --- --- --- --- C-- ---
A28     -- -C- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- T-- --- --- ::: --- --- --- --- --- --- ---
Au24    -- -CA --- --- --- --- --- G-- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ::: --- --- --- --- --- --- ---

B27     -- -C- --- --- --- T-- --- G-- --- --- --- --- --- T G-- --- --- --- -C- G-- --A -C- -T- ::: --- G-- -TC --- --- --- --- ---
B7      -- -C- --- --- --- T-- --- G-- --- --- --- --- --- T G-- --- --- --- -C- G-- --A -C- -T- ::: --- G-- -TC --- --- --- --- ---
B8                                                                                                  -- --A -C- -T- ::: --- G-- -TC --- --- --- --- ---

Cu3     -- -C- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- G-- --- --- --- -C- G-- --G -CT -TC CTA -CT G-- CTA --- --- --- --G ---
Cu1     -- -C- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- G-- --- --- --- -C- G-- --G -CT -TC CTA -CT G-- CTA --- --- --- --G ---

12.4    -- -CA --- --- --- --- --- G-- --- --- --- --- --- G-- --- --- T-- --- --A --- -T- --- ::: --- G-- --- --- --- --- --- ---

                                        310                     Exon 6                  320                     Exon 7                  330
A3      GCC GTG ATG TGG AGG AGG AAG AGC TCA GAT AGA AAA GGA GGG AGT TAC ACT CAG GCT GCA AGC AGT GAC AGT GCC CAG GGC TCT GAT GTG
A2      --T --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --C --- T-- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
A28     --T --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --C --- T-- --- --- --- --- --- --- --A -T --- --- --- --- ---
Au24    --T --- --- --- --- --- --C --- --- --- --- --- --- --- --C --- T-- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

B27     --T --- --- --T --- --- --- --- --- -G- G-- --- --- --- --C --- T-- --- --- --G T-- --C --- --- --- --- --- --- --- ---
B7      --T --- --- --T --- --- --- --T --- -G- G-- --- --- --- --C --- T-- --- --- --G T-- --C --- --- --- --- --- --- --- ---
B8      --T --- --- --T --- --- --- --- --- -G- G-- --- --- --- --C --- T-- --- --- --G T-- --C --- --- --- --- --- --- --- ---

Cu3     -TT --- --- --T --- --- --- --- --- -G- G-- --- --- --- --C -G- T-- --- --- --G TC- --C A-- --- --- --- --- --- --- -A-
Cu1     -TT --- --- --T --- --- --- --- --- -G- G-- --- --- --- --C -G- T-- --- --- --G TC- --C A-- --- --- --- --- --- --- -A-

12.4    --T --A --- --- --- -A- --- --- --- --- --- --- --- --- --C --- T-- --- --- --- --- --C A-- --- --- --- --- --- --- ---

A3      TCC CTC ACA GCT TGT AAA G
A2      --T --- --- --- --- --- -
A28     --T --- --- --- --- --- -
Au24    --T --- --- --- --- --- -

B27     --T --- --- --- --A --- -
B7      --T --- --- --- --A --- -
B8      --T --- --- --- --A

Cu3     --T --- -TC --- --- --- -
Cu1     --T --- -TC --- --- --- -

12.4    --T --- --G --- --: --- C

        Exon 8 + 3'UT           20                  30                  40                  50                  60                  70                  80                  90                  100                 110                 120
A3      TGTGAGACAG CTGCCTTGTG TGGGACTGAG AGGCAAGAGT TTGTTCCTGC CCTTCCCTTT GTGACTTGAA GAACC:CTGA CTT:TGTTTC TGCAAAGGCA CCTGCATGTG TCTGTGTTCG
A2      ---------- ---------- ---------- ---------- -:---G----- ---------- ---------- -----:---- ---:------ ---------- ---------- ----------
A28     ---------- ---------- ---------- ---------- -::::----- -GC:------ ---------- -----::--- ---:------ ---------- ---------- ----------
Au24    ---------- ---------- -:-------- ---------- -:--:----- ---------- ---------- -----:---- ---:------ ---------- ---------- ---------A

B27     CC-------- ---T------ A--------- -T---G--:- --C---AC-- -:-C------ --------C-- --G--T---G -A-C-C---- ---------- ----A------ ----C--C-C
B7      CC-------- ---T------ A--------- -T---G--:- --C---AC-- -:-C------ --------C-- --G--T---G AC:C-C---- ---------- ----A------ ----C--C-C

Cu3     CC-------- ------:--- ---------- -T---G--:- --C---ACA- -TC----:--- --------C-- --G--T---G -A-C-C---- ---------- T---A------ ----C----C
Cu1     CC-------- ------:--- ---------- -T---G--:- --C---ACA- -TC----:--- --------C-- --G--T---G -A-C-C---- ---------- T---A------ ----C----C

12.4    ---------- ---------- ---------- ---------- -:--------- -:--------- ---------- ---:-C---- -A--------- ----A------ ---------C

        130                 140                 150                 160                 170                 180                 190                 200                 210                 220                 230                 240
A3      TGTAGGCATA ATGTGAGGAG GTGGGGAGA: CCACCCCACC CCCA:TGTCC ACCATGACCC :TCTTCCC:A CBCTGA:CCT GTGCTCCCTC CCCAATCATC TTTCCTGTTC CAGAGAGGTG
A2      ---------- ---------- ---------: ------:--- ----:----- ---------- :-------:- -------:-- ---------- ---------- ---------- ----------
A28     ---------- ---------- ---------: ------:--- ----:----- ---------- :----T--C- -------:-- ---------- ---------- ---------- ----------
Au24    ---------- ---------- ---------A ---------- ----A----- ---------- :--------A- --------A- ---------- ---------- ---------G ----------

B27     ---TA----- ---------- ----A----: --G------ ---G:----- --TG------ C-G------:- T------:-- ---T-T---- ----G------ ---------- ----------
B7      ---TA----- ---------- ----A----: -:-G------ -TTG:----- --TG------ C-G------:- T------:-- ---T-T---- ----G------ ----T------ ----------

Cu3     ---TA----- ---------- ----A----: -:-G------ ---:----- ---G------ C-G-C----:- -A-----:-- ---T------ ---G------ ---------- ------A---
Cu1     ---TA----- ---------- ----A----: -:-G------ ---G:----- -

12.4    ---------- -----T---- -A-------: ---A------ -T--:----- ---------- :--------C- ------:-:- ---T------ ---------- ---------- -------A-

        250                 260                 270                 280                 290                 300                 310                 320                 330                 340                 350                 360
A3      GGGCTGAGGT GTCTCCATCT CTGTCTCAAC TTCATGGTGC ACTGAGCTGT AACTTCTTCC TTCCCTATTA AAATTAG:AA CCTT:AGTAT AAATTTACTT TCTCAAATTC TTGCCATGAG
A2      ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------:-- ---G:----- ---------- ---------- ---------- ----------
A28     -AA----:-- ---------- ---------- --:------- ------:--- ---------- AA----G-:-- ------AG--- ---GGG---- ---------- ---------- ----------
Au24    --------T- ---------- ------G--- ---------- ---------- ---------- ---------:-- ---G:----- ------:--- ---------- ---------- ----------

B27     ------:-A- ---------- ---------- --T---:--- ---------C ---------A- --------C-G ---A--AG-- T-:G:-A---- ------GT-- --------AT ----T------
B7      ------:-A- ---------- ---------- --T-C-:--- ---------C ---------A- --------C-G ---A--A-:-- T--G:-A---- ------GT-- --------AT ----T------

Cu3     --:---:-A- ----------- ---------- ---------- ---------G ---------C ---------A- --------A-G --G------G-- ---G:-A---- ------GT-- --------AT ----T----A
12.4    ---------A- ---------- T-T------- --T---:--- ---------- ---:------A- ------C--- ------:-:-- T---G------A -C--------- -T--------- ----------

        370                 380                 390                 400                 410                 441
A3      AGG:TTGATG AGTTAATTAA AGGAGAAGAT TCCTAAAATT TGAGAGACA AAATAAA       TGGAAGACCT GAGAACCTT: CCAG
A2      ---:------ ---------- ---------- ---------- --------- -------       ---------- ---------: ----
Au24    ---:------ ---------- ---------- ---------- --------- -------       ---------- ---------: ----

B27     ---:------ GA-------- -TA--TCA-- ----GG---- --------GC -------       ::--:::--- ---------: ----
B7      ---:------ GA-------- -TA--TCA-- ----GG---C --------GC -------       ::--:::--- ---------: ----

Cu3     G--:------ GA-------- -TA--TCA-. ----GG--G- --------GC -------       ::--:::--- ------G---T ----

12.4    ---G------ -C-------- ---------- ---------- --------- -------       ------C---A- ---------: ----
```

Mikroglobulin interagiert. Während hier HLA-B bzw. HLA-C Allele untereinander fast identisch sind (bei HLA-B ein "stiller", bei HLA-C ein effektiver Austausch aus 276 Nukleotiden), zeigen die HLA-A Allele stärkere Variabilität, allerdings unter Beibehaltung des oben erwähnten Charakteristikums dieses Exons: 52% der Substitutionen sind "stumm" im Vergleich zu nur 13% in Exon 2 und 10% in Exon 3. Was die restlichen Exons betrifft, so wird ein schon in Exon 4 auffallendes, locuskorreliertes Muster fortgesetzt und verstärkt - vergleiche Abbildung 19 - bis hin zu unterschiedlichen Positionen der Terminationscodons.

Während dem Pseudogen 12.4 (Malissen 1982) in den Exons 1, 2 und 3 noch durchaus der Charakter eines typischen HLA-Antigens zugestanden werden könnte, so ist seine nachfolgende Divergenz von diesen insofern auffallend, als daß sich bei den HLA-ABC Produkten in diesen Bereichen locusspezifische Sequenzmarker heraus zu kristallisieren beginnen (vergleiche dazu auch Kapitel 3.3), die in der Sequenz des Klons 12.4 nur sehr bedingt und nur kleinsträumig gefunden werden konnen. Vergleicht man den 3'UT-Teil (siehe Abb. 19) der HLA Molekule, so ist es offensichtlich weshalb Nukleotidsequenzen aus diesem Bereich als locusdiskriminiernde Proben verwendet werden konnten (siehe Abb. 19 und Tabelle 6). Es ist allerdings ebenso erkennbar, weshalb eine HLA-B (im Gegensatz zu einer HLA-A) locusspezifische Sonde ein schwaches Signal mit einem HLA-C Transkript (Klon pC1) ergab: Homologie des 3'UT: HLA-A/-C 82%, dagegen HLA-B/-C 92%, wahrend die Intralocus-Homologien durchwegs >95% sind (siehe Tabelle 6). Ein weiteres, wahrscheinlich noch günstigeres Segment zur Identifizierung der verschiedenen HLA Gene kann in Exon 5 gefunden werden (hervor-

gehoben in Abbildung 19). Proben aus dieser Region fanden im Maussystem schon entsprechende Verwendung (Kress 1983) und sind für Untersuchungen an humanem Material in Vorbereitung.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Sequenz der beiden pB-Klone alle typischen Charakteristika einer HLA mRNA besitzt und die größte Homologie zu dem Transkript des HLA-B7 Gens (Biro 1983, 1985) aufweist (siehe Tabelle 6). Da von der Zellinie LG-2 das Produkt des HLA-A2 Locus aufgrund von Sequenzdaten (siehe Kapitel 2.5.2) eindeutig bestimmt werden konnte, ebenso partielle Sequenzen (pC1) anhand ihrer klaren Homologie zu HLA-Cw3 (Sodoyer 1984) als Transkript des HLA-Cw1 Locus, kann aufgrund des Phänotyps der autozygoten Zellinie LG-2 (HLA-A2,A2; -B27,B27; -Cw1,Cw1) die HLA-B Sequenz dem HLA-B27 Gen zugeordnet werden. Eine zusätzliche Bestätigung der Richtigkeit dieser vorgenommen Zuweisung der pB-cDNA zum HLA-B27 Locus liefert die rezente Publikation von Ezquerra (1985), in der die teilweise Peptidsequenz des HLA-B27 Antigens der gleichen Zellinie vorgestellt ist. Durch die in dieser Arbeit vorgestellten Sequenzen des HLA-B27 Antigens und partiell von HLA-Cw1 ist es zum ersten Mal möglich, zwei HLA-B Allele auf Nukleotidebene und teilweise zwei HLA-C Allele zu vergleichen. Während die Gegenüberstellung der bekannten HLA Klasse I DNA-Sequenzen in Abbildung 19 eine qualitative Beurteilung der Substitutionen erlaubt, faßt Tabelle 6 diese Daten in Zahlen. Dabei sind Austausche, Deletionen bzw. Insertionen als Einzelereignisse gewertet worden. Aufgeführt sind gemittelte Werte (in % Identität) aus einzelnen Vergleichen von jeweils einem HLA Transkript mit den restlichen Sequenzen. Den Homologien auf Nukleotidebene wurden diejenigen auf Proteinebene nachgestellt, da letztere die angelegte

Tabelle 6 INTRA- UND INTER-LOCUS HOMOLOGIEN

	HLA A / A	HLA B / B	HLA C / C	HLA A / B	HLA A / C	HLA B / C	HLA A / Pseu	HLA B / Pseu	HLA C / Pseu
Exon 1 *LEADER*	96	84	nb	86	90	89	95	88	91
Exon 2 *ALPHA 1*	95 *91*	95 *87*	nb *nb*	90 *82*	87 *79*	91 *81*	85 *73*	92 *80*	87 *74*
Exon 3 *ALPHA 2*	95 *90*	95 *91*	nb *nb*	91 *82*	90 *81*	93 *87*	91 *84*	91 *85*	91 *83*
Exon 4 *ALPHA 3*	96 *95*	100 *100*	100 *99*	91 *95*	90 *92*	95 *93*	97 *96*	93 *97*	93 *95*
Exon 5 *TM*	97 *93*	97 *100*	100 *100*	87 *73*	82 *69*	87 *85*	92 *85*	88 *80*	80 *72*
Exon 6 Exon 7 *ZYT*	97 97 *96*	98 100 *100*	100 100 *100*	86 94 *83*	84 87 *73*	96 87 *79*	99 88 *84*	88 92 *86*	85 87 *71*
Exon 8+3ut	98	99	99*	82	82	92	92	82	79
Nukleotide *PROTEIN*	97 *92*	97 *94*	nb	88 *85*	87 *82*	92 *87*	92 *84*	88 *87*	86 *82*

Angegeben sind die Prozent identischer Positionen auf Nukleotidebene (Normalschrift) und Proteinebene (Kursivschrift)

Tendenz noch deutlicher zu Tage treten lassen. Die Werte der Gesamthomologien lassen erkennen, daß Allele untereinander ähnlicher (auf Nukleotidebene >95%, auf Peptidebene 92% Identität) sind, als Produkte verschiedener Loci (Identität auf Nukleotidebene 86-91%, auf Proteinebene 82-87%). Darüberhinaus ist es vielleicht interessant festzustellen, daß das Pseudogen 12.4 - als Pseudogen eingestuft aufgrund mehrerer Kriterien (siehe Malissen 1982 und Jordan 1985) - in der Homologie der kodierenden Regionen zu den HLA-ABC Sequenzen keinem dieser Loci besonders auffallend ähnlich ist. Allerdings scheint der 3'UT Bereich des Klons 12.4 mit der entsprechenden Region der HLA-A Allele mehr Gemeinsamkeiten zu teilen als mit HLA-B oder HLA-C. Auf eventuell mögliche Folgerungen dieser Beobachtung wird in Kapitel 3.4 näher eingegangen.

3.2. Die abgeleitete Proteinsequenz von HLA-B27 im Vergleich mit bekannten HLA Peptidsequenzen

Die von den Nukleotidsequenzen voraussagbare Proteinsequenz des HLA-B27 Antigens (Abb.20) enthält die bekannten Charakteristika einer HLA Klasse I schweren Kette (Ploegh 1981): konservierte Cysteinreste für die internen Disulfidbrücken, an Positionen 101 und 164 für die α2- und Positionen 203 und 259 für die α3-Domäne, sowie eine N-Glykosylierungsstelle an Position 86.

Beim Vergleich der HLA-B Allele untereinander ist die komplette Identität dieser ab Domäne α3 (HLA-B27, -B7 und -B40) bis zum carboxyterminalen Ende des Moleküls (HLA-B27, -B7 und -B8) auffallend. Eine ähnliche Situation kann bei den erst partiell vergleichbaren HLA-C Allelen vorgefunden werden -

eine Eigenschaft, mit der sich die Produkte dieser beiden Loci von denen der HLA#Gene absetzen, da letztere in diesen Regionen eine größere Variabilität aufweisen (siehe Abbildungen 20 und 21), wie dies schon bei den Nukleotidsequenzen erkennbar war.

Im polymorphen Anteil des Moleküls (α1 und α2) zeigt die HLA-B27 Sequenz den gleichen Grad an Divergenz zu den Primarstrukturen von HLA-B7 (21 Aminosaureaustausche) und HLA-B40 (23 Austausche). Dabei liegen etwa 50% dieser Substitutionen in zwei als hypervariabel charakterisierten Bereichen von HLA Klasse I Molekülen, zwischen den Positionen 63-82 bzw. 177-182; die andere Hälfte der Austausche zeigt keine Kluster (siehe Abb.20 und 21), wobei allerdings einige der vereinzelten Residuen ebenfalls zu stark variablen Positionen gehören (z.B. Position 9). Die Art fast sämtlicher Austausche paßt in das bereits erwahnte Mosaikbild (siehe Kapitel 1.3.5 "Polymorphismus"), da fast alle in den vergleichbaren HLA-Sequenzen schon schon vertreten sind. Diese beschränkte Variabilität spiegelt hierbei wohl strukturelle Auflagen wider.

Auf der Suche nach möglichen strukturellen Anhaltspunkten für die einmaligen Eigenschaften des HLA-B27 Antigens, können fünf Substitutionen (siehe "*" -Markierung in Abb.20) ausgemacht werden, die in den bislang sequenzierten HLA Molekülen an den entsprechenden Positionen nicht zu finden sind. Drei davon, nämlich Lysin (Position 70), Asparagin (Position 97) und Valin (Position 182) bilden konservative Austausche; sie belegen stark variable Positionen, wo ihr Vorkommen zwar eine bestimmte Bedeutung beinhaltet, jedoch keinerlei offensichtlich einmalige Änderung hinsichtlich Struktur und biologischer

Aktivität hervorruft, da ähnliche Aminosäuren (bzgl. Größe, Polarität, Ladung) in den anderen Allelen zu finden sind.

Die verbleibenden beiden Aminosäuren stellen dagegen ungewöhnliche Austausche dar und sollen aus diesem Grund etwas ausführlicher besprochen werden. Position 67 ist von einem potentiell reaktiven Cystein besetzt; diese Aminosäure könnte durch ihre Lage in einem Bereich, von dem angenommen wird, daß er bei der Bindung monoklonaler wie auch von Alloantikorpern beteiligt ist (Orr 1979, Hämmerling 1982, Lopez de Castro 1983), sehr wohl Einfluß haben auf intermolekulare Wechselwirkungen. Es ist allerdings noch nicht möglich, die Relevanz einer derartigen Substitution abzuschätzen, auch im Hinblick auf die Feststellung, daß ein ebenfalls ungebundenes Cystein an einer ähnlich polymorphen Stelle in der HLA-Cw3 Sequenz beschrieben wurde. Analysen der Proteinsequenz dieses Antigens (Ezquerra 1985) haben gezeigt, daß dieser Cysteinrest im Molekül selbst keine Bindung eingeht.

Im Gegensatz dazu ist das Auftauchen eines Serins auf Position 131 wirklich einzigartig, und das in mehrererlei Hinsicht: dieser nicht konservative Austausch hat an einer Stelle stattgefunden, die immer (in über 20 Sequenzen) von einer basischen Aminosäure eingenommen ist, einem spezies-spezifischen Arginin beim Menschen (siehe Abb.20) und Lysin bei der Maus (Maloy 1982); Lysin wird tatsächlich in allen bekannten H-2 Klasse I Sequenzen vorgefunden, einschließlich H-2K^{d}, H-2K^{vb} (Morita 1985) und auch in den nicht klassischen Produkten Q8 und Q10 der Balb/C (Sher 1985) sowie Q4-Q10 der C57BL/10 Maus (E. Weiss, pers. Mitteilung); im Kaninchen, der einzigen weiteren Spezies, von der MHC Klasse I Sequenzen vorliegen, ist diese Position ebenfalls von einem Arginin

besetzt (Marche 1985). Position 131 ist in einem Molekülsegment (Aminosäure 122-131) eingebettet, welches wahrscheinlich strengen selektiven Zwängen unterliegt, da es den evolutionär konserviertesten Bereich der zweiten Domäne repräsentiert. Da keine Sekundärstruktur für den Abschnitt 129-136 vorausgesagt werden kann (Vega 1984), ist es unmöglich, über die Art der Auswirkungen einer solchen Substitution zu spekulieren. Es ist jedoch anzunehmen, daß ein Austausch der voluminösen basischen Aminosäure Arginin durch einen kleinen ungeladenen, polaren Rest (Serin) besondere, und wahrscheinlich, drastische Konsequenzen auf die Struktur des HLA-B27 Antigens hat.

3.3. Sequenzmarker der klassischen HLA Klasse I Moleküle

Durch die partielle Sequenz von HLA-Cw1, d.h. eines zweiten HLA-C Allels, ist es möglich, aufgrund der bisherigen Sequenzdaten von HLA Antigenen, einige vorläufige verallgemeinernde Feststellungen zu treffen bezüglich locusspezifischer Marker auf Protein- und/oder Nukleotidebene.

Ein solches locusspezifisches Merkmal ist die unterschiedliche Länge der adulten HLA-ABC Peptide mit jeweils 341, 338 und 342 Aminosäuren. Während HLA-B Transkripte ein Termina-

---

Abb. 20 Peptidvergleich bekannter HLA Sequenzen

Die aufgelisteten Aminosäuresequenzen sind von den Nukleotidsequenzen aus Abb. 19 abgeleitet und durch Proteindaten erganzt.
Proteindaten: HLA-A28 (Orr 1979), HLA-B40 (Lopez de Castro 1983)
* markieren HLA-B27 spezifische Positionen, die im Text diskutiert werden.
Schraffur hebt Positionen hervor, die als spezifische Marker für die HLA-ABC Loci angesehen werden können.
Doppelpunkt wurde wegen HLA-C eingeführt, um die Homologie zu maximieren.

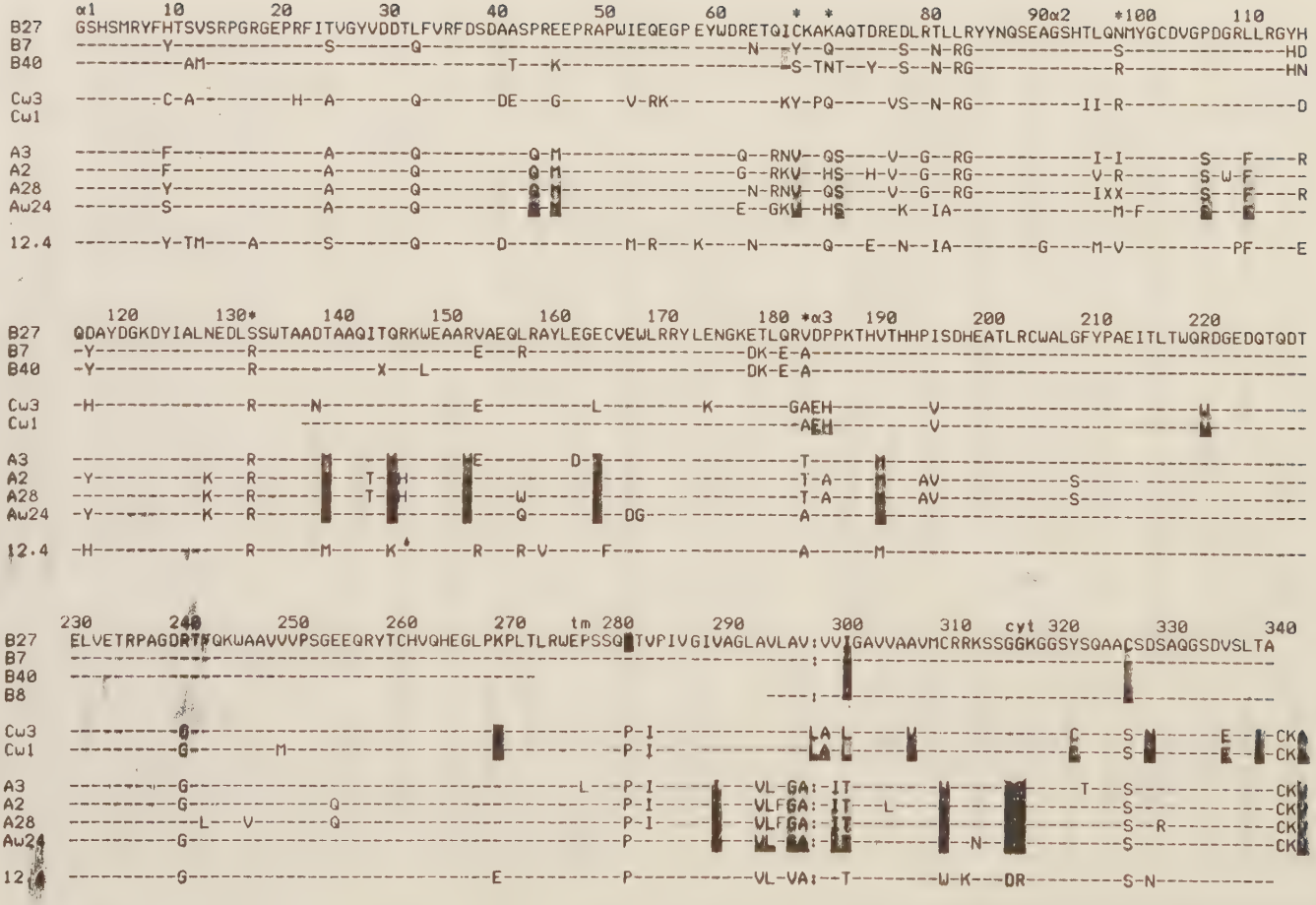


Abb. 20 Peptidvergleich bekannter HLA Sequenzen

tionscodon in Exon 7 haben, wird bei HLA-A und HLA-C das erste Stopcodon in Exon 8 verwendet. Die unterschiedliche Länge der beiden letztgenannten Produkte kommt durch eine zusätzliche Aminosäure in der transmembranen Region bei HLA-C Produkten zustande (siehe Abb.20, Aminosäure zwischen den Positionen 296/297); hierbei ist auffällig, daß das dafür kodierende Triplett Teil einer direkten Wiederholung (direct repeat) des Nonamers GCT GTC CTA ist (siehe Abb. 19).

Weiterhin können Positionen identifiziert werden, welche eine charakteristische intraallelische Konservierung aufweisen (beachte grau unterlegte Aminosäuren in Abb.20) - dabei soll jedoch hier nicht zur Diskussion stehen, ob sie das Resultat eines passiven oder aktiven Vorgangs darstellen. Diese Konservierung ist auf Nukleotidebene noch verstärkt erkennbar durch gleiche "wobbling"-Positionen innerhalb von Allelen, im Gesamtbild jedoch schlechter zu beobachten wegen der Spreizung der Nukleotidsequenzen. Bemerkenswert ist, daß diese diagnostischen Stellen in den verschiedenen Allelen häufig an unterschiedlichen Positionen liegen. Folglich scheinen sie Regionen zu kennzeichnen, die nicht durch Ereignisse derjenigen Art bearbeitet wurden, wie sie für den starken Polymorphismus der

---

Abb. 21 Plot-Darstellung der HLA-Klasse I Variabilität in Intra- und Inter-Locus Vergleichen

Die Sequenzen der Abbildung 20 wurden entsprechend der Formel von Kabat & Wu transformiert:

$$\text{Variabilitätsindex} = \frac{\text{Anzahl der unterschiedlichen Aminosäuren an einer bestimmten Position}}{\text{Frequenz der häufigsten Aminosäure}}$$

Daraus ergibt sich als minimaler Wert 1, als Maximalwert nach Anzahl der Vergleiche, für HLA-ABC 100 (10 Vergl.); für HLA-A 16 (4 Vergl.); für HLA-B 9 (3 Vergl.) und für HLA-C 4 (2 Vergl.)

Abb. 21

Klasse I Gene postuliert werden (Bregegere 1983). Diese markanten Positionen befinden sich hauptsächlich, jedoch nicht ausschließlich, in der transmembranen und zytoplasmatischen Region der Moleküle. Zählt man sie ab Domäne α3 (hier beginnend ist erst ein gültiger Vergleich für HLA-C Allele möglich), so ergeben HLA-A 12, HLA-B 4 und HLA-C 13 Positionen, in denen Allele untereinander identisch und gleichzeitig verschieden von den Produkten der anderen HLA Loci sind. Dabei werden fast sämtliche für HLA-B typischen Positionen erfaßt, während HLA-A Allele noch 10 weitere in den polymorphen Molekülregionen aufweisen. Diese Diskrepanz scheint weniger auf die Auswahl der verglichenen Allele zurückführbar zu sein, da sowohl in den HLA-A als auch den HLA-B Sets kreuz- und nicht kreuzreagierende Antigene vertreten sind. Eine andere Interpretation dieser Befunde ist wahrscheinlicher. Es ist anzunehmen, daß eine stärkere Einwirkung der für den Polymorphismus verantwortlichen Mechanismen auf die HLA-B Gene eine derartig offensichtliche Konservierung ausgelöscht hat. Ein Hinweis in gleicher Richtung ist die Tatsache, daß bei den MHC Produkten für den HLA-B Locus die größte Anzahl von Allelen gefunden wird (siehe Albert 1984). Sollten sich aufgrund weiterer Daten Untergruppen innerhalb eines Locus herauskristallisieren - andeutungsweise schon bei den HLA-A Allelen erkennbar -, wurde ein solches Ergebnis den Verdacht untermauern, daß die im Augenblick definierten Loci eigentlich pseudoallelische Serien darstellen (Bodmer 1973).

3.4. Überlegungen zur Evolution der HLA Gene

Aus einem Inter-Locus Vergleich (Abb.19 und 20, sowie Tabelle 6) wird klar, daß HLA-A und HLA-C Antigene über alle Molekülbereiche gleichermaßen die geringste Homologie teilen, anderseits HLA-B/HLA-C Gemeinsamkeiten häufig über denen von HLA-A und HLA-B liegen. Ganz besonders deutlich wird dies im 3'UT Teil (vergleiche die 3'UT Homologie: HLA-B/-C: 92% versus HLA-A/-B 82%; oder anders ausgedruckt, 49 B/C identische Positionen, an denen HLA-A andere Nukleotide enthält versus 12 A/B und 8 A/C). Es bedarf allerdings noch weiterer Analysen von HLA Sequenzen, einschließlich der flankierenden Regionen und Introns, um die sich abzeichnende Tendenz zu verifizieren, daß eine Duplikation jüngeren Datums von einem HLA-B Gentyp zu der Entstehung des HLA-C Locus führte.

Hierbei ist auffallend, daß auf dem Chromosom benachbarte HLA Gene untereinander anscheinend eine größere Homologie besitzen als weiter entfernte. Dies trifft nicht nur für das eben vorgestellte Beispiel HLA-B/HLA-C zu, sondern auch für HLA-A im Vergleich mit dem Pseudogen 12.4 (siehe Tabelle 6), welches telomer von HLA-A eingeordnet werden kann (Biro 1985). Eine alternative Vorstellung zur Erklärung der stärkeren Ähnlichkeit benachbarter HLA Gene wäre eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für einen gegenseitigen Austausch von genetischem Material, z.B. via Genkonversion. Diese Annahme ist jedoch, da widerspruchlich, weniger attraktiv. Wenn nämlich ein solcher Mechanismus für die Homogenisierung dieser Gene verantwortlich ist, so muß einerseits festgestellt werden, daß er nicht besonders häufig vorkommt, da locus-spezifische Sequenzmarker gefunden werden konnen, anderseits

die Notwendigkeit besteht, ihn von demjenigen Typ zu unterscheiden, der die Sequenzaustausche in den polymorhen Regionen bewirkt.

Ein auf verschiedene Spezies ausgeweiteter Vergleich macht deutlich, daß die erwähnten HLA-ABC Sequenzmarker einschließlich ihrer Position nicht mit denen übereinstimmen, die im Maussystem als charakteristisch für H-2KDL (Kress 1983) angesehen werden. Diese Feststellung ist ein starker Hinweis dafür, daß, in Analogie mit gewissen Klasse III Genen der Maus (Levi-Strauss 1985), die Duplikation von Klasse I Genen nach der Aufspaltung in diese beiden Spezies stattfand. Weitere Beobachtungen untermauern diese Schlußfolgerung: innerhalb einer Spezies findet man eine strenge Konservierung von Introns (Biro 1985, Sher 1985), welche z.B. einen Maus/Mensch Vergleich dieser Bereiche zum Teil unmöglich macht; zusätzlich ist in allen Klasse I Sequenzen der Maus (H-2KDL und Qa) - verglichen mit den entsprechenden Regionen beim Menschen (Guild 1984) - eine "Aminosäurelücke" in dem von Exon 7 kodierten Bereich erkennbar, bedingt durch die konsequente Nutzung von alternativen Splicesignalen in den unterschiedlichen Spezies.

Ein solches Modell steht einerseits im Gegensatz zu den in der Immungenetik des MHC vorherrschenden Konzepten, daß der Allelismus (Klein 1981a und b) und die Locusvielfalt (Bodmer 1984) vor der Speziesdivergenz der Säuger existierte, ist anderseits in guter Übereinstimmung mit der Tatsache, der bis dato keine Studien widersprechen, daß die Duplikationen dieser Loci noch zu keiner ausgeprägten funktionellen Auseinanderentwicklung geführt haben.

3.5. Überlegungen zur Assoziation HLA-B27 und Ankylosierende Spondylitis

Die Ergebnisse dieser Arbeit erlauben zwei mögliche Rückschlüsse hinsichtlich der Assoziation von HLA-B27 mit A.S., welche allerdings indirekter Natur sind, da der Donor (jetziges Alter 30 Jahre) der LG-2 Zellinie keine klinische Vorgeschichte besitzt. Dies wiederum weist jedoch auf das Problem hin, HLA-B27$^+$ Individuen zu identifizieren, bei denen eine später auftretende, mit diesem Antigen assoziierte Erkrankung mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Ob die beiden vorgestellten, ungewöhnlichen Aminosäuresubstitutionen (Cystein auf Position 67 und Serin auf Position 131) des HLA-B27 Antigens von Bedeutung für die Krankheitssuszeptibilität sind, muß noch festgestellt werden. Dazu bedarf es vor allem der Sequenzanalyse der HLA-B27 Varianten. Vorläufige Daten solcher Untersuchungen (Vega, Meeting Abstract #108) scheinen allerdings die Annahme zu bestärken, daß die beiden auffälligen Austausche in der Tat als mögliche molekulare Marker für die Assoziation mit der Krankheit in Frage kommen, da sie einerseits äußerst ungewöhnlich sind und anderseits, ebenso wie die Krankheit selbst, mit keinem der einzelnen Subtypen korrelieren.

Sollte dennoch ein "Suszeptibilitätsgen" im Kopplungsungleichgewicht mit HLA-B27 (mit einem Koeffizienten von 0,019, siehe Kidd 1977, d.h. 90% des möglichen Maximums) verantwortlich sein für die vorgefundenen Krankheitsassoziationen, so muß eine entsprechende Mutation vor dem Auftreten der HLA-B27 Varianten stattgefunden haben, weil keine ein vorherrschendes Kopplungsungleichgewicht mit dem postulierten Gen zeigt. Eine Vorstellung über die mögliche Lokalisierung

des postulierten Locus im Bezug auf das HLA-B27 Gen vermittelt eine Rechnung, die folgende Umstände in Betracht zieht: eine Rekombinationsdistanz (r) zwischen HLA-B27 und dem hypothetischen Locus von 10^{-3}; Abnahme des Koeffizienten des Kopplungsungleichgewichts unter Hardy-Weinberg Bedingungen: (1-r) pro Generation; Alter des postulierten Gens mindestens 25.000-100.000 Jahre (d.h. 1.250-5.000 Generationen). Diese Zeitspanne, die seit der Divergenz der großen ethnischen Gruppen verstrichen ist (Cavalli-Sforza 1969), kann aufgrund der Tatsache, daß die HLA-B27/A.S. Assoziation in allen nachgewiesen wurde (siehe Kapitel 1.5.) als Zeitparameter eingesetzt werden. Unter Verwendung dieser Angaben zeigt die Berechnung, daß jegliches Kopplungsungleichgewicht eigentlich verschwunden sein müßte oder aber, daß die Rekombinationsdistanz geringer als 10^{-3} ist. Eine weitere Annahme von 10^{6} bp pro Centimorgan (Kornit 1979) macht deutlich, daß, sollte ein solcher "Suszeptibilitätslocus" tatsächlich existieren, er innerhalb weniger tausend bp in der Umgebung des HLA-B27 Gens zu finden sein müßte. Da jetzt die Sequenzdaten von HLA-B27 sowohl auf Proteinebene (Ezquerra 1985) als auch DNA-Ebene bekannt sind, sollte eine direkte Identifizierung dieses postulierten Locus, die bislang wegen der starken Homologie unter den HLA Klasse I Genen praktisch unmoglich war, durch eine Analyse des Genoms von Patienten wahrscheinlich sein. Zusätzlich ermöglicht die Zugänglichkeit der cDNA Klone von HLA-B27 auch eine Untersuchung des Kreuzreaktivitätsmodells.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. Material

4.1.1. Verwendete Chemikalien

Chemikalien	
Acrylamid	Biorad
Agarose Typ II	Sigma
Agarose vom "low melting" Typ	Sigma oder Seakem
Aminothiophenol	Aldrich
Ampholine	Pharmacia
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Trypton	Difco
Biogel A 1,5 200-400 mesh	Biorad
BIS (N,N'- Methylenbisacrylamid)	Biorad
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma
Caesiumchlorid	BRL
Desoxyribonukleosidtriphosphate	PL Biochemicals
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma
Dextransulfat	Serva
Didesoxyribonukleosidtriphosphate	Amersham/Boehringer
Diglycidyläther	Aldrich
Dimethyldichlorosilane	Sigma
DTT (Dithiothreitol)	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
Fötales Kälberserum	Seromed
Ficoll...	Sigma
Guanidin Hydrochlorid	BRL
Harnstoff	Biorad
Hefeextrakt	Difco
Hepes (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanesulfonic acid)	Sigma

IPTG (Isopropyl-ß-D-thiogalakto-pyranosid)	Sigma
Kaliumacetat	Fluka
oligo-dT_{12-18}	PL Biochemicals
oligo-dT Zellulose	Collaborative Research
oligo-Ribonukleosidtriphosphate	Boehringer
Polyvinylpyrrolidin K90	Fluka
Quecksilbermethylhydroxid	Alfa Products
RPMI 1640	Seromed
Sephadex G-50	Pharmacia
Silane A174	Pharmacia
Spermidin	Sigma
Saccharose	BRL
Temed (N,N,N',N'Tetramethylethylen-diamine)	Biorad
Vanadyl-Ribonukleosid Komplexe	BRL
X-gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-ß-D-galaktopyranosid)	Sigma

Weitere Chemikalien, die hier nicht extra aufgeführt worden sind, wurden von Merck bezogen. Sämtliche Chemikalien haben p.A. Qualität.

Antibiotika	
Ampicillin	Sigma
Chloramphenicol	Seromed
Penicillin	Gibco
Streptomycin	Gibco
Tetracyclin-Hydrochlorid	Sigma

4.1.2. Radiochemikalien

α-^{32}P-dNTP	Amersham
α-^{35}S-dATP	Amersham
L-^{35}S-Methionin	Amersham

4.1.3. Enzyme

Restriktionsenzyme

Bezugsquelle für die Restriktionsenzyme war Boehringer, nur Sac I und Hinf I stammten von Biolabs.

Sonstige Enzyme

AMV Reverse Transkriptase	Beard, Life Science
DNA Polymerase I (Kornberg Polymerase)	Boehringer
DNA Polymerase I (Klenow Fragment)	Boehringer/Amersham
DNase I	Boehringer
Proteinase K	Merck
RNase A	Boehringer
RNase T	Boehringer
RNase Inhibitor RNasin	Biotech
S1 Nuklease	Sigma
T4-DNA Ligase	Boehringer
Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase	PL Biochemicals

4.1.4. Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide

E.coli C600 (Appleyard 1954)

F^-, thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, ton A21, sup E44, lambda$^-$

E.coli JM101 (Messing 1979)

lacpro, thi, sup E, F', traD36, proAB, lacI^{q}ZM15

Bezugsquelle: Amersham

pBR322 (Bolivar et al., 1979)

Geschenk von Prof. Wolf

$pBR322_{6512-18}$

Bezugsquelle: Amersham

M13 mp8, mp10, mp11 (Messing et al., 1982)

Bezugsquelle: Amersham

4.1.5. Zellinien

LG-2 (Gatti et al. 1979)

Epstein Barr-Virus transformierte B-Zellen

Mel-Juso (Johnson et al. 1981)

Zellinie etabliert von einem primären humanen Melanom

4.1.6 Medien

für Zellkultur

Kulturmedium

RPMI 1640

dekomplementiertes fötales Kälberserum (10% v/v)

2mM L-Glutamin

1mM Natriumpyruvat

pH: 7,2 Osmolarität: 300 mosmol

Penicillin: 100 U/ml

Streptomycin: 100ug/ml

PBS (phosphate buffered saline) pH 7,2

137mM NaCl

3mM KCl

8mM $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$

2mM KH_2PO_4

für Bakterienkultur

Minimalmedium	34mM Na_2HPO_4
	22mM KH_2PO_4
	18mM NH_4Cl
	9mM NaCl
	1mM $MgSO_4$
	0,1mM $CaCl_2$
	1mM Thiaminhydrochlorid
	0,2% (w/v) Glukose
Minimalplatten	Minimalmedium mit 1,5% (w/v) Bacto-Agar
LB-Medium	1% w/v Bacto-Trypton
	0,5% w/v Hefeextrakt
	86mM NaCl
LB-Platten	LB-Medium mit 1,5% (w/v) Bacto-Agar
Einfriersalzlösung	55mM K_2HPO_4
	27mMKH_2PO_4
	3mM Na-citrat
	0,7mM $MgSO_4 \times 7\ H_2O$
	14mM $(NH_4)_2SO_4$
	8,8% (w/v) Glycerol
2xTY-Medium	1,6% w/v Bacto-Trypton
	1% w/v Hefeextrakt
	86mM NaCl
H-Medium	1% w/v Bacto-Trypton
	137mM NaCl
H-Platten	H-Medium mit 1,2% (w/v) Bacto-Agar
H-Top-Agar	0,8% w/v Bacto-Agar
	1% w/v Bacto-Trypton
	137mM NaCl

Falls erforderlich wurde den Medien bzw. den Platten folgende Mengen Antibiotika beigesetzt:

Tetracyclin-Hydrochlorid	12.5 ug/ml
Ampicillin	35 ug/ml
Chloramphenicol	170 ug/ml

4.1.7. Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Chloroform	heißt immer Chloroform:Isoamylalkohol = 24:1
Phenol pH 8,0	nach Destillation mit 0,1% w/v Hydroxychinolin versetzt, ausgeschüttelt mit 0,1M Tris-HCl pH 8,9 und schließlich mit 10mM Tris-HCl pH 8,0
Phenol/Chloroform	Phenol (pH 8,0):Chloroform:Isoamylalkohol 25:24:1
1x SSC	0,15M NaCL 15mM Na-citrat pH 7,0
TE pH 7,0 (7,5, 8,0)	10mM Tris-HCl pH 7,0 (7,5, 8,0)
TBE pH 8,0	89mM Tris 89mM Borsäure 4mM EDTA
100x Denhardt's	2% w/v Ficoll... 2% w/v PVP 2% w/v BSA

4.1.8. Sonstiges

Nitrozellulosefilter BA 85 (Porengröße 0,45 um)	Schleicher & Schüll
Szintillationsflüssigkeit Rotiszint	Carl Roth

Instagel	Packard
Zellulose Cellex 180	Schleicher & Schüll
Röntgenfilme	CEA, Schweden
Polaroid Typ 107 Fotos	
Enlightning™	NEN

4.2. METHODEN

4.2.1. Zellkultur

Eukaryontische Zellinien werden bei 37° C, 5% Kohlendioxid und 95% Luftfeuchtigkeit propagiert. Absicherung gegen Kontamination geschieht durch Verwerfung eventuell verdächtiger Kulturen.

Während die B-Zellinie in Suspension wächst, wachsen Melanomzellen adhärent und können erst nach einer 15 minütigen Behandlung mit 1mM EDTA in PBS abgeerntet werden. Nach mehrmaligen Waschungen mit PBS werden sie bis zum Zeitpunkt der RNA Isolierung in PBS mit 10mM Vanadyl-Ribonukleosid-Komplexen (Berger 1979) gesammelt und bei - 80°C gelagert.

4.2.2. Häufig verwendete Methoden

Fällung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren werden in Anwesenheit von Salz mit Äthanol (>50% v/v) bei Kälte gefällt. Soweit im Text nicht besonders erwähnt, wird durch Zugabe von Natriumacetat pH 5,0 ad 0,3M mit 2 (bei DNA) bzw. mit 2 1/2 Volumina Äthanol (bei RNA oder kleinen DNA Fragmenten) während einer Inkubation in Trockeneis (bis das Gemisch geliert), bei -20°C (>2 h) oder bei 4°C im Falle von chromosomaler DNA, präzipitiert. Salzzugabe entfallt, wenn die Losung hohe Salzkonzentration enthält. Nach der Fällung wird das Nukleinsaurepellet grundsätzlich zweimal

mit 70% Äthanol sorgfältig gewaschen und nach Verflüchtigung von Alkoholresten in wäßrigem Milieu gelöst.

Konzentrierung von Lösungen

DNA- und RNA-Lösungen können durch Ausschütteln mit 2n-Butanol eingeengt werden, da der Alkohol der Lösung Wasser entzieht. Die Konzentrierung der Lösung wird in mehreren Schritten durch Ausschütteln mit gleichem Alkoholvolumen erreicht.

Phenolextraktion

Die zu extrahierende Lösung wird mit einem gleichen Volumen an Phenol pH 8,0 (entsprechend Phenol/Chloroform oder Chloroform) gründlich gemischt. Die Phasen werden durch Zentrifugation getrennt und der wäßrige, Nukleinsäure enthaltende Überstand unter Vermeidung der Interphase abgenommen.

Spot-Test

Dieser Test dient zur schnellen Quantifizierung von geringen Nukleinsäuremengen (Sensitivität liegt bei 1ug/ml). Dazu wird auf eine 1% Agaroseplatte, die 1ug/ml Ethidiumbromid enthält, je 1ul von DNA- bzw. RNA-Standards in verschiedenen Verdünnungen aufgetragen, und die Fluoreszenz der zu bestimmende Probe damit verglichen.

4.2.3. RNA Arbeiten

4.2.3.1. Isolierung von RNA

Isolieren von zellulärer RNA
(Strohman 1977)

Die eingefrorenen Zellen werden bei Raumtemperatur langsam aufgetaut und solange noch Eisklumpen vorhanden sind, in einen auf -15°C vorgekühlten Homogenisierungspuffer (8M Guanidin-

HCl, 20mM Na-acetat pH 5.0, 1mM DDT) gegeben. Temperaturkonstanz gewahrleistet ein Trockeneis-Methanol Bad. Das Verhältnis des durch die Zellen eingebrachten Eigenvolumens wird hierbei so gewählt, daß die Endkonzentration von Guanidin-HCl nie unter 6M sinkt (Miller 1978).

Zellen und DNA werden durch die Scherkrafte eines Ultra-Turrax 18N Stabes bei Kalte zerkleinert (dreiviertel der maximalen Geschwindigkeit für 45 Sekunden) und partikuläre Teilchen gleich anschließend durch Zentrifugation (4000xg, 30 min, -15°C) aus dem Homogenat entfernt. Nach Athanolfallung wird das Pellet in 1/5 des Ausgangsvolumens in EDTA-haltigem Puffer (8M Guanidin-HCl, 20mM EDTA pH 7,0, 1mM DDT) gelost, nach erneuter Fällung in 1/20 Ausgangsvolumens 20mM EDTA pH 7,0, wodurch gleichzeitig die Vanadylverbindungen komplexiert werden. Durch Waschen mit 3M Natriumacetat pH 6.0 und Inkubation bei 4°C können restliche Proteine, DNA sowie kleine RNA Molekule (tRNA, 5S rRNA) entfernt werden. Das RNA Pellet wird noch einige Male in EDTA aufgenommen und präzipitiert (immer bei -20°C). Lagerung der RNA erfolgt entweder als Athanolpräzipitat oder als in H_2O gelöstes Aliquot bei -80°C.

Isolierung von poly A⁺-RNA
(Aviv 1972)

Entsprechend der Bindungskapazität (1g oligo dT-Zellulose bindet 40-150 A_{260} poly A⁺-RNA) wird oligo dT-Zellulose nach Bedarf eingewogen und eine Stunde in H_2O bei Raumtemperatur gequollen.

Eine kleine Säule wird in einer mit Glaswolle gestopften Pasteurpipette aufgefullt, grundlich mit sterilem bidestilliertem Wasser gewaschen und schließlich mit dem 10fachen Saulenvolumen an 0,5M TEK-puffer (10mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM

EDTA, 0,5M KCl) äquilibriert. In H_2O gelöste RNA wird mit dem gleichen Volumen an 2x konzentriertem 0,5M TEK-puffer versetzt, 5 Minuten bei 68°C denaturiert und sofort anschließend in Eis abgekühlt. Nach Auftragung der RNA (3x Reapplikation) wird die beladene Saule mit einem 25fachen Säulenvolumen an 0,5M TEK-puffer und zweifachen Saulenvolumen an einem Puffer geringerer Salzkonzentration (10mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA, 0,1M KCl) gewaschen. Die Elution von poly A^+haltiger mRNA erfolgt mit einem 15fachen Säulenvolumen an TE-puffer. Das RNA-haltige Eluat wird mit 2n-Butanol eingeengt und in Anwesenheit von 0,4M Ammoniumacetat gefällt.

4.2.3.2. Größenauftrennung über Saccharosegradient (McCarty 1974)

Mit Hilfe eines isokinetischen Dichtegradienten erhält man eine sehr gute Größenauftrennung entsprechend dem Sedimentationskoeffizienten der einzelnen RNA Molekule. Sämtliche Apparaturen, welche zum Gießen des Gradienten, oder aber zum Gewinnen der einzelnen Fraktionen nach der Ultrazentrifugation benutzt werden, mussen mit 0,1% v/v DEPC-Lösung sterilisiert und grundlich mit H_2O nachgespült werden, um Ribonuclease Aktivität auszuschließen.

Der exponentielle Dichtegradient von 10-30% w/v Saccharose (gelöst in 10mM Hepes, 5mM EDTA, 25mM NaCl, pH 7,0) wird direkt in die UZ-Rohrchen gegossen. Nach einer einstündigen Ruhephase bei 8°C wird der Gradient mit der denaturierten RNA-Probe (20mM Quecksilbermethylhydroxid in 20mM Boratpuffer) beladen und in einem SW 40 Rotor in einer Beckmann Ultrazentrifuge bei 4°C und 120000xg 16 Stunden lang gefahren. Als Kontrollauf dient eine Probe mit 28S und 18S rRNA.

Nach Beendigung des Laufes wird die aufgetrennte RNA

fraktioniert. Hierfür wird durch eine automatische Vorrichtung 50% Saccharoselösung von unten in das UZ-Röhrchen eingebracht, die den Gradienten aus dem Röhrchen in den Fraktionskollektor schiebt. Von den 30 aufgefangenen Fraktionen wird die optische Dichte bestimmt und entsprechend dem rRNA Kontrollauf in ein Diagramm eingezeichnet. Nach Alkoholfällung werden die Fraktionen, in H_2O gelöst, bei -80°C gelagert.

4.2.3.3. Hybridselektion von RNA

Durch kovalente Bindung einer bestimmten DNA an eine Trägersubstanz erhält man ein Reagenz, mit welchem aus einer gemischten RNA Population spezifische RNAs selektiv angereichert werden können.

Kovalente Kopplung von DNA an aktivierte Zellulose
(Seed 1982)

Das Zellulosepulver wird zunächst derivatisiert. Nach jeweils einem Waschschritt mit 50% v/v Äthanol und 0,6N NaOH wird das Pellet in alkalischem Milieu mit Diglycidyläther (0,3N NaOH, 30% v/v Diglycidyläther) über Nacht unter Rühren bei Raumtemperatur inkubiert (da der anfallende Überstand toxisch ist, wird er vor dem Wegkippen für 24 Stunden in 0,5M Ammoniumhydroxid inaktiviert). Das Pellet wird dreimal mit 50% v/v Äthanol gewaschen und anschließend vier Stunden lang unter Rühren mit Aminothiophenol (0,25N NaOH, 1% v/v Aminothiophenol in Äthanol) behandelt. Nach jeweils drei Waschungen mit 50% v/v Äthanol, 0,1M HCl und schließlich mit absolutem Äthanol wird die derivatisierte Zellulose (APT-Zellulose = o-Aminophenylthioäther Zellulose) vakuumgetrocknet.In dieser Form ist sie bei -20°C lagerfähig. Je nach Bedarf wird eine bestimmte Menge APT-Zellulose mit Natriumnitrit (0,027% Natriumnitrit, frisch angesetzt, 1,2M HCl) in einer

15minütigen Reaktion aktiviert. Die zu koppelnde DNA (entweder durch Ultraschallbehandlung oder durch enzymatische Spaltung mit anschließender Reinigung in die geeignete Form gebracht) wird in einer Konzentration von 10mg/ml in Phosphatpuffer aufgenommen (25mM pH 6,0) und mit DMSO ad 75% v/v versetzt. Nach 5 Minuten bei 50°C und Eisschock wird die DNA auf das Zellulosepellet gegeben (ca. 100ug DNA pro 10mg APT-Zellulose). Eine möglichst vollständige und gleichmäßig verteilte Kopplungsreaktion wird durch stetiges Auf- und Abpipettieren während der zehn Reaktionsminuten gefördert. Freie DNA Fragmente werden mit H_2O ausgewaschen, ungesättigte Bindungsstellen der Zellulose durch eine 10 minütige Inkubation bei 37°C in 0,4N NaOH abreagiert. Die so hergestellte DNA-Zellulose kann bei 4°C in 0,4N NaOH gelagert werden.

RNA Hybridselektion

Zunächst wird mit der DNA-Zellulose eine Scheinelution vorgenommen, um sicher zu gehen, daß nicht unkontrolliert DNA von der Zellulose abgeht. Hierfür wird die NaOH, in welcher gelagert wurde, mit Wasser bis zu einem neutralen pH ausgewaschen. Dann wird die DNA-Zellulose in Wasser eine Minute lang gekocht und sofort in einem Trockeneis/Äthanol-Bad schockgefroren. Bei Raumtemperatur wird langsam aufgetaut, zentrifugiert und der Überstand auf eventuell vorhandene DNA in einem Spot-Test analysiert. Diese Prozedur wird zweimal vorgenommen. Anschließend wird bei 45°C drei bis vier Stunden lang in 20mM Pipes pH 7,0, 0,4M NaCl, 0,04% w/v PVP, 10ug/ml tRNA, 10ug/ml poly A und 50% v/v Formamid prähybridisiert. Die spezifische Hybridisierung findet in 20mM Pipes pH 7,0, 0,4M

NaCl, 50% v/v Formamid über Nacht statt, ebenfalls bei 45°C, mit 200ug zellulärer RNA in einer Reaktionskonzentration von 4-5mg/ml. Nicht gebundenes, sowie der große Teil von unspezifisch gebundenem Material wird durch die folgenden Waschvorgänge entfernt: zweimal bei 55°C je 10 Minuten lang mit 10mM Pipes pH 7,0, 0,15mM NaCl, 0,2% w/v SDS, zweimal bei 55°C mit dem gleichen Puffer ohne SDS und fünf Mal auch ohne SDS, aber bei Raumtemperatur. Elution der spezifisch gebundenen RNA erfolgt wie bei der Scheinelution. Die mit diesem Verfahren angereicherte RNA ist biologisch aktiv, z.B. in einem in vitro Translationssystem.

4.2.3.4. RNA Agarosegel-Elektrophorese

Da RNA Moleküle in wäßrigen Lösungen zu intra- und intermolekularen Doppelstrangstrukturen aggregieren können, sind akkurate Molekulargewichtsbestimmungen nur unter stark denaturierenden Bedingungen durchführbar. Daher wurden Gelsysteme entwickelt, die Formamid, Glyoxal, Harnstoff, Formaldehyd und Quecksilbermethylhydroxid als denaturierendes Agens enthalten, wobei ein jedes erhebliche Vor- und Nachteile aufweist.

Gele mit Quecksilbermethylhydroxid-denaturierter RNA (Bailey 1976)

Für analytische Zwecke wird ein 1,5mm dickes 0,8-1% w/v Agarosegel in quecksilberhaltigem Boratpuffer (50mM H_3BO_3, 5mM $Na_2B_4O_7$, 10mM Na_2SO_4, pH 8,2, 10mM MeHgOH) aufbereitet. Etwa 2-5 ug RNA (in Probenauftragspuffer: 0,125% w/v Bromphenolblau, 0,125% w/v Bromkresolpurpur, 0,012% w/v Ficoll$_{400}$, 10mM MeHgOH) konnen ohne Uberladungseffekte aufgetrennt werden. Bei dieser Art von Gelen wurde die vertikale Elektrophorese unter Pufferrezirkulation bevorzugt. Nach Anfarbung mit Ethidium-

bromid (1ug/ml in Boratpuffer, sowie 0,1M Ammoniumacetat zum Neutralisieren von MeHgOH) kann die RNA unter UV betrachtet werden.

RNA Gele mit Formaldehyd
(Lehrach 1977)

Formaldehydgele zur RNA Auftrennung werden als horizontale Gele untergetaucht in Puffer gefahren. Als Laufpuffer für die 1-1,5% w/v Agarosegele dient 20mM Borat pH 8,1, 0,2mM EDTA, 3% v/v Formaldehyd. Die RNA Proben werden in H_2O aufgenommen, während einer 30minütigen Inkubationten bei Raumtemperatur mit MeHgOH (ad 10mM) denaturiert und nach Zugabe von Probenpuffer ad 80% v/v (50% v/v Formamid, 6% v/v Formaldehyd, 20mM Borat pH 8,1, 0,2mM EDTA, 10% v/v Glyzerin) aufgetragen. Die Gele werden zur schönen Auftrennung über Nacht bei geringer Voltzahl gefahren.

4.2.3.5. RNA Transfer und Immobilisierung auf Nitrozellulose

RNA "Dots"

RNA wird punktförmig auf vorbehandelte Nitrozellulose aufgetragen - daher die gelegentliche Übersetzung mit "Tüpfeltest". Zunächst werden die Nitrozellulosefilter 20 Minuten gewässert und dann mindestens eine Stunde lang in 20x SSC inkubiert. Auf die luftgetrockneten Filter wird hitzedenaturierte RNA (3min 68°C, Eisschock) in einem 2ul Volumen aufgetragen. Sobald die Filter trocken sind werden sie 2 Stunden bei 80°C unter Vakuum gebacken.

"Northern-Blotting"
(Thomas 1980)

Beim "Northern-Blotting" wird elektrophoretisch aufgetrennte RNA auf Nitrozellulose übertragen. Nach beendetem Lauf werden

DNA- und RNA-Marker vom restlichen Gel abgetrennt, in TBE-Puffer äquilibriert, mit Ethidiumbromid (1ug/ml) angefärbt und unter UV Licht fotografiert. Das restliche Gel wird ohne jegliche weitere Behandlung sofort zum Blotten verwendet. Dazu wird es auf eine Glasplatte mit dickem Filterpapier gelegt, dessen überstehende Ränder aus einem Pufferreservoir Flüssigkeit (10x SSC) nachziehen. Direkt auf das Gel wird ein Blatt Nitrozellulose (in H_2O angefeuchtet, anschließend 2-3 Minuten in 10 x SSC getränkt) gelegt. Zwei ebenfalls in 10 x SSC getränkte, auf das Gelformat zurechtgeschnittene Filterpapiere werden auf die Nitrozellulose gelegt, darauf kommt noch ein Stapel saugfähiger Papiertücher und abschließend ein mittelschweres Gewicht auf eine weitere Glasplatte, damit der ausgeübte Druck möglichst gleichmäßig verteilt wird. In dieser Anordnung wird die RNA über Nacht auf die Nitrozellulose transferiert und durch anschließendes Backen bei 80°C unter Vakuum fixiert.

4.2.3.6. RNA Hybridisierung (Thomas 1980)

Die Absättigung unspezifischer Bindungen geschieht durch die Prähybridisierung bei 43°C über Nacht in 50mM Phosphat pH 7,0, 5xSSC, 5xDenhardt's, 0,2% SDS, 10ug/ml Poly G, 10ug/ml Poly A, 200ug/ml denaturierte Kompetitor-DNA, meistens Lachssperma-DNA, sowie 50% v/v Formamid. Die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Probe ($5-50 \times 10^5$ cpm/ml) findet unter gleichen Bedingungen statt, wobei mindestens 24 Stunden bei 43°C inkubiert wird. Nicht gebundene Radioaktivität wird durch zwei Waschungen bei Raumtemperatur mit 2xSSC, 0,2% SDS jeweils 30 Minuten lang ausverdünnt, während unspezifisch gebundene Radioaktivität durch drastischere Bedingungen, nämlich

0,1xSSC, 0,2% SDS entfernt wird. Die Autoradiographie erfolgt mit den trockenen Nitrozellulosefiltern bei Raumtemperatur.

4.2.3.7 In vitro Translation und Immunpräzipitation

Ein typischer Translationsansatz besteht aus 65% v/v selbst herggestelltem Kaninchen-Retikulozytenlysat (supplementiert mit ATP, GTP, Kreatinphosphat, DTT, Spermidin und einem Aminosäuregemisch ohne Methionin), eine für die jeweilige mRNA auszutestende Konzentration an Kaliumacetat (50mM), Kaliumchlorid (50mM), Magnesiumacetat (1,7mM), sowie tRNA (0,16mg/ml) und ^{35}S-L-Methionin (1 uCi/ul). Zelluläre RNA wird mit 150-200ug/ml, poly A$^+$-mRNA je nach Reinheitsgrad mit 10-100ug/ml eingesetzt.

Nach zweistündiger Translation bei 30°C wird die Reaktion durch EDTA (3mM) gestoppt und Proteinabbau durch PMSF- und Benzamidinhydrochloridzugabe (ad je 3mM) verhindert.

Eine anschließende Immunpräzipitation muß in Betracht ziehen, daß Vorläufermoleküle synthetisiert werden und daher Antikörper nur begrenzt einsatzfähig sind. Sie erfolgt mit an Sepharose-Protein A gekoppelten Antikorpern. Hierzu wird der Translationsansatz mit einem gleichen Volumenanteil des folgenden Puffers gemischt: 50mM Hepes pH 8,0, 1,5% v/v NP40, 150mM NaCl, 77,5% v/v gamma-Globulin-freies FCS versetzt. Die Präzipitation selbst geschieht bei 4°C für mindestens zwei Stunden. Die Anzahl der anschließenden Waschschritte (mit 40mM Hepes pH 8,0, 1M NaCl, 0,5% v/v NP40) wird durch die eingesetzte Menge an Radioaktivitat bestimmt und so gewählt, daß diese auf alle Fälle ausverdünnt ist. Zwei letzte Waschschritte mit 40mM Hepes pH 8,0 sollen das nichtionische Detergenz entfernen, welches bei einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese stören würde (siehe Kapitel Proteinarbeiten).

4.2.4. cDNA
(Maniatis 1982, Retzel 1980)

4.2.4.1. Synthese des 1. Stranges (ss cDNA)

Für die Reaktion werden 1-25ug RNA eingesetzt, die mit Quecksilbermethylhydroxid (1,25mM) 30 Minuten lang bei Raumtemperatur denaturiert wird. Durch Mercaptoäthanol (30mM) wird nicht abreagiertes Quecksilberhydroxid inaktiviert. Die eigentliche Erststrangsynthese findet bei 42°C während einer 100 minütigen Inkubation unter folgenden Bedingungen statt: RNase Inhibitor RNasin 1 U/ul, oligo-dT_{12-18} Primer 50ug/ml, 50mM Tris-HCl pH 8,3, 10mM $MgCl_2$, 0,1M KCl, jedes der vier Deoxynukleotide 0,5mM, ein oder zwei ^{32}P-markierte Deoxynukleotide als Tracer, 10-15uCi bei einer spezifischer Aktivität von 800Ci/mmol und AMV-Reverse Transkriptase mit 2 U/ug RNA. Gestoppt wird die Reaktion durch Zugabe von EDTA (50mM) und SDS (0,5% w/v). Durch Probenentnahme zum Zeitpunkt 0 und 100 Minuten wird TCA-fällbares Material bestimmt. Aus dem Prozentsatz von inkorporierter Radioaktivität kann der Anteil von eingebauten Desoxynukleotiden berechnet und damit die Masse des synthetisierten Materials abgeschätzt werden.
Nach der Synthese werden die DNA/RNA-Hybride phenolisiert und gefällt. Das Nukleinsäurepellet wird in Wasser aufgenommen und die nun nicht mehr erwünschte RNA aus dem Hybrid mit Natriumhydroxid entfernt (60 Minuten bei 50°C in 0,3M NaOH und 10mM EDTA). Pufferaustausch sowie Eliminierung der aus der Hydrolyse angefallenen Ribonukleotide wird mit Hilfe einer Biogel A 1,5-Säule vorgenommen. Die Makromoleküle im Ausschlußvolumen werden in Fraktionen aufgefangen. Nach der Fallung kann die ss cDNA zur Synthese des Komplementarstranges eingesetzt werden.

4.2.4.2. Synthese des 2. Stranges (ds cDNA)

Loop-Bildung am 5'Ende der ss cDNA stellt den internen Primer für die Zweitstrangsynthese dar.Als Enzym kann die Reverse Transkriptase, endonukleasefreie DNA-Polymerase I oder ein Gemisch von beiden eingesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Reverse Transkriptase auch zur Synthese des zweiten Stranges benutzt.

Das ss cDNA Pellet wird in H_2O aufgenommen und 3 Minuten lang bei 68°C denaturiert. Die Reaktionsbedingungen für die Synthese des 2. Stranges sind gleich wie bei der Erststrangsynthese, mit Ausnahme von RNase Inhibitor, Radioaktivität und Primer, die jetzt nicht mehr gebraucht werden. Nach Beendigung der Reaktion wird phenolisiert. Pufferaustausch und Entfernung von nicht eingebauten Desoxynukleotiden geschieht erneut über eine Biogel A 1,5 Säule, wobei mit S1-Puffer (0,3M NaCl, 3mM $ZnCl_2$, 30mM Na-acetat pH 4,6) äquilibriert und eluiert wird.

4.2.4.3 S1-Nuklease Reaktion der ds cDNA

Diese Reaktion ist erforderlich, um cDNA mit glatten Doppelstrangenden zu generieren, welche später als Substrat für die Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase fungieren. Besonders der Loop, der für die Synthese des komplementären DNA Stranges als Primer dienlich war, muß entfernt werden.

S1-Nuklease degradiert hauptsächlich DNA und RNA, welche in Form von Einzelstrang vorliegen, baut jedoch auch doppelsträngige RNA oder DNA vollständig ab, wenn diese mit einem großen Überschuß an Enzym inkubiert werden. Durch Titration des Enzyms und elektrophoretische Analyse der Abbauprodukte wird die Enzymkonzentration ermittelt, bei der möglichst quantitativ nur einzelsträngige DNA verdaut wird.

Als optimal wurden folgende Bedingungen ausgearbeitet: Inkubation der ds cDNA bei 37°C 30 Minuten lang mit einer Konzentration an Enzym von 0,5 U/ml, in einem Puffer von 0,3M NaCl, 3mM $ZnCl_2$ und 30mM Na-acetat, pH 4,6. Gestoppt wird durch Neutralisieren mit Tris-HCl pH 8,0 und EDTA (10mM).
Vergleichend getestet werden Ausgangsmaterial und die Produkte der S1-Reaktion auf einem denaturierenden, alkalischen Agarosegel. Anschließend wird die DNA phenolisiert und präzipitiert. Diese cDNA kann sofort oder nach einer Größenselektion getailed werden. Größenselektion kann von Vorteil sein, da kleine cDNA Moleküle größtenteils unfertige Produkte darstellen, anderseits jedoch preferentiell in die Vektormoleküle eingebaut werden. Im vorliegenden Fall wurde die cDNA auf einem TBE-Gel (siehe DNA Fragmentisolierung) elektrophoretisch aufgetrennt und die Größenbereiche von 400 - 1000 bp und 1000 - ca.2500 bp eluirt und getrennt weiterbehandelt.

4.2.4.4 Homopolymeres Tailing der cDNA

Beim Homopolymer-Tailing wird an den jeweiligen 3'Enden der rekombinanten ds cDNA mit dem Enzym Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase eine definierte Anzahl eines bestimmten Nukleotids angebracht. Analog wird die Vektor- DNA behandelt, wobei hier das komplementäre Nukleotid verwendet wird. Am häufigsten findet das dG:dC Tailing Anwendung, mit welchem in die Pst I Schnittstelle unter Beibehaltung dieser Restriktionsmöglichkeit kloniert werden kann.
Für die Klonierung der cDNA wurde ein bereits dG getailter pBR322 Vektor eingesetzt. Da dieser Vektor laut Angabe jeweils 12-14 dG-Reste an jedem 3'Ende besitzt, wurde die Tailing Reaktion mit der cDNA so ausgelegt, daß die Fragmente eine

ähnliche Anzahl an dC-Resten an ihren 3'Enden enthalten. Erreicht wird das durch eine Zeittitration der enzymatischen Reaktion mit anschließender Messung der Transformationseffizienz.

Die cDNA (50ng) wird in einem Ansatz von 50ul in Anwesenheit von 0,1mM dCTP, 0,1M K-cacodylat, 25mM Tris, 1mM $CoCl_2$, 0,2mM DTT bei einem pH von 7,5 und mit einer Enzymkonzentration von 0,4 U/ul getailed. Vor Enzymzugabe wird der Ansatz auf 37°C kalibriert, um die Temperatur für die sehr kurze Reaktion kontrollierbar zu machen. Die Tailing-Reaktion selber dauert nur 45 Sekunden und wird in Trockeneis/Äthanol gestoppt. Nach Zugabe von EDTA ad 10mM wird langsam bei Raumtemperatur aufgetaut, phenolisiert und mit Äthanol gefällt. Die weiteren Schritte sind im Kapitel "Klonieren von DNA" beschrieben.

4.2.5. DNA Arbeiten

4.2.5.1 Isolierung von DNA

Isolieren von chromosomaler DNA

Um cytoplasmatische Verunreinigungen in der DNA-Praparation zu vermeiden, wird eine Kernpräparation von mit PBS gewaschenen kultivierten Zellen vorgenommen. Dazu wird das Zellpellet in kalter 25mM Zitronensäure resuspendiert und mit Hilfe eines losen Potters aufgebrochen. Während einer Zentrifugation bei 1000xg, 4°C zehn Minuten lang, sedimentieren die Kerne. Nach mehrmaligen Waschungen mit Zitronensäure erfolgt die Kernlyse mit 1% w/v SDS in 10mM Tris-HCl pH 8,0, 0,15M NaCl und 10mM EDTA. Durch eine Inkubation mit Proteinase K (50ug/ml) bei 37°C werden Proteine verdaut und die Lösung wird sehr visköse. Weitere Handhabungen müssen daher vorsichtig durchgeführt

werden, um die hochmolekulare chromosomale DNA mechanisch nicht zu schädigen. Anschließend werden die Abbauprodukte der Proteine mit wiederholten Phenolextraktionen eliminiert.
Nach Fällung der DNA wird restliche RNA durch RNase A Verdau (50ug/ml, 4 Stunden bei 37°C) entfernt. Nach erneuter Fällung wird die DNA in TE-Puffer gelöst. Die DNA Menge wird photometrisch bestimmt, die Qualität der Praparation durch ein analytisches 0,4% w/v Agarosegel (siehe DNA Gele). Dabei sollte intakte chromosomale DNA langsamer laufen als ein ungespaltene lambda-DNA.

Isolieren von Plasmid DNA
(Ish-Horowicz 1981)

Schnellpräparation

Etwa 7 ml Medium werden mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Nach Zentrifugation wird das Bakterienpellet in 200ul kaltem Glucose-Puffer (25mM Tris-HCl pH 8,0, 10mM EDTA, 50mM Glukose) resuspendiert. Nach Zugabe von einem doppelten Volumen an NaOH-Lösung (0,2N NaOH, 1% w/v SDS) wird 5 Minuten lang auf Eis inkubiert. Mit 0,75M Kaliumacetat pH 4,8 werden aus der Losung Proteine, Kohlehydrate, Fette und hochmolekulare DNA ausgefällt und durch Zentrifugation (15 Minuten bei 12000xg) entfernt. Der Überstand wird bei Raumtemperatur mit 0,6 Volumina an Isopropanol versetzt, was bei dem hohen vorhandenen Salzgehalt zur Präzipitation von niedermolekularen Nukleinsäuren führt. Das Pellet wird in 50ul TE-Puffer pH 8,0 gelost und mit RNase A (200ug/ml) eine halbe Stunde lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wird phenolisiert und präzipitiert.
Auf diese Art kann man zwischen 10-50ug Plasmid DNA isolieren, die mit Restriktionsenzymen spaltbar ist.

Präparative Plasmidisolierung

Die Methodik entspricht der der Schnellpräparation, wobei die Menge der zugegebenen Lösungen für 1 l Bakterienkultur als Ausgangsmaterial modifiziert werden. Nach Isopropanolfällung wird das Nukleinsäurepellet von einem Liter Bakterienkultur in 3,6 ml TE-Puffer aufgenommen; 3,6g Cäsiumchlorid werden eingewogen und 360ul einer 10% w/v Ethidiumbromidlösung zugegeben. DNA-Menge und Endvolumen sind hierbei so berechnet, daß keine Überladung des Caesiumchloridgradienten entsteht. Zentrifugiert wird bei 40.000rpm, 20°C, 36 Stunden lang. Der Gradient (Dichte: 1,55g/ml) trennt die erwünschte Form (supercoiled) von restlicher chromosomaler DNA, RNA und defekter Plasmid-DNA. Nach Beendigung des Laufes wird die resultierende Plasmidbande mit einer Injektionsspritze abgezogen. Zu der plasmidhaltigen Lösung werden zwei Volumina H_2O gegeben und die Mischung mit Phenol/Chloroform mehrmals extrahiert und gefällt. Von 1 l Bakterienkultur sollte man mit dieser Methode mindestens zwischen 0,5-1mg saubere Plasmid DNA erhalten.

Isolieren von einzelsträngiger Phagen DNA
(Messing 1977)

ss Phagen DNA (M13 Phagen) wird für die Sequenzierung mit der Didesoxy-Methode nach Sanger benötigt.

Von einer Übernachtkultur an E. coli Wirtsbakterien (Stamm JM101) wird eine 1:100 Verdünnung in 2xTY-Medium angesetzt, 1,5ml davon mit einem phagenhaltigen Plaque angeimpft und 5 Stunden bei 37°C geschüttelt. Anschließend werden die Bakterien abzentrifugiert und aus dem Überstand die sezernierten Phagen, als Träger der zu isolierenden ssDNA, mit PEG (ad 3,3% w/v) und NaCl (ad 0,45M) gefällt (15 min bei Raumtemperatur). Nach der Zentrifugation muß der PEG-haltige

Überstand sorgfältigst entfernt werden (z.B. mit ausgezogenen Kapillaren), da Spuren von PEG der Sequenzierreaktion behindern. Das Phagenpellet wird in TE-Puffer pH 7,5 gelöst und 2x phenolisiert, um die viralen Proteine zu entfernen. Die DNA wird mit Äthanol präzipitiert. Von 1,5ml Kulturüberstand erhält man genügend DNA, um 10 Sequenzierreaktionen durchzuführen.

4.2.5.2. DNA Spaltung mit Restriktionsenzymen

Die DNA eines bestimmten Bakterienstammes wird durch eine besondere Enzymklasse stammspezifisch durch Methylierung von Basen an definierten Stellen modifiziert; an diesen Stellen unmodifizierte DNA wird gleichzeitig restringiert, d.h. gespalten. Mittlerweile sind über 400 solcher Enzyme beschrieben worden. Besonders die sogenannten Typ II Endonukleasen, bei denen Bindungs- und Spaltstelle indentisch und überdies spezifisch sind, werden bei in vitro DNA Arbeiten eingesetzt. Bei der hydrolytischen Spaltung mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen können drei unterschiedliche Arten an DNA Enden entstehen, glatte Enden (z.B. bei Pvu II) und, bei versetzter Spaltung, 3'(z.B. bei Pst I) oder 5'überstehende Enden (z.B. bei Taq I).

Die Bedingungen für optimale Aktivität der Enzyme (Temperatur, pH, Salzzusammensetzung und Salzkonzentration) konnen Beschreibungen entnommen werden. Üblicherweise wird ein Verdau mit einem Enzym:DNA Verhältnis von 1U/1ug DNA während einer einstündigen Inkubation bei Reaktionstemperatur (fast ausschließlich 37°C) durchgefuhrt und anschließend in einem Agarose-Testgel analysiert.

4.2.5.3. DNA Agarosegel-Elektrophorese (McDonell 1977)

Samtliche DNA Agarosegele waren horizontale Gele, die bei der Elektrophorese in Puffer untergetaucht gefahren wurden. In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsachlich 3 Geltypen verwendet: normale TBE-Gele, zur Großenauftrennung von ds DNA, alkalische Agarosegele, um DNA unter denaturierenden Bedingungen analysieren zu können, sowie Gele aus Agarose mit speziell niedrigem Schmelzpunkt, zur Isolierung von DNA Fragmenten.

TBE-Agarosegele

TBE ist der Puffer der Wahl für die DNA Agarosegel-Elektrophorese, da seine Pufferqualitäten denen der herkömmlichen Acetat- und Phosphatpuffer überlegen sind.

Die Agarosekonzentration wird durch die Größe der aufzutrennenden DNA bestimmt.

Für schnelle Tests (auswertbares Ergebnis innerhalb einer halben oder 1 Stunde) werden kleine Gele gefahren (5cmx10cmx0,2cm), deren Auflösungsvermögen nach Ethidiumbromid -Anfärbung bei ca. 10ng pro Bande liegt.

Große Gele (20cmx20cmx0,6cm) werden hauptsächlich verwendet, wenn anschließend Transfer auf Nitrozellulose vorgenommen wird. Um die Auflösung der DNA-Fragmente zu maximieren, findet der elektrophoretische Lauf mit nicht mehr als 5 V /cm statt.

Alkalische Agarosegele

Der Vorteil dieser Gele ist es, ss DNA denaturiert entsprechend der Basenanzahl aufzutrennen, ohne daß Wechselwirkungen aufgrund von Sekundärstruktur interferieren.

Als Probenpuffer wird 50mM NaOH, 10mM EDTA, 0,025% w/v Bromphenolblau, 2,5% w/v Ficoll... verwendet. Die Elektrophorese erfolgt in 30mM NaOH, 2mM EDTA langsam über Nacht mit ca.

2 V/cm, um Überhitzung des Gels zu vermeiden. Nach Laufbeendigung wird in 50mM Tris-HCl pH 7,0 neutralisiert, mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UVLicht fotografiert oder, bei radioaktiver Markierung, auf Film exponiert.

4.2.5.4. Isolierung von DNA Fragmenten

DNA Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend aus den Gelen eluiert.

Agarosegele
(Weislander 1979)

Diese Methode wird hauptsächlich verwendet um ds DNA (cDNA, Restriktionsfragmente für Nicktranslationen oder Subklonieren) zu isolieren.

Für diese Gele benutzt man Agarose vom Low melting Typ, deren Schmelzpunkt bei 65°C liegt. Bei der Elektrophorese, die wie schon beschrieben in TBE durchgeführt wird, wird besonders darauf geachtet, daß keine Überladung stattfindet und der Lauf langsam vonstatten geht, um Überhitztung des Gels und damit bedingt schlechte Auftrennung zu vermeiden.

Nach Beendigung des Laufes wird die erwünschete Bande unter langwelligem UV Licht (360nm) ausgeschnitten, die Agarose bei 65°C geschmolzen und sofort mit Phenol extrahiert. Nach anschließenden Zentrifugation befindet sich die Agarose in der Interphase. Die obere DNA-haltige wäßrige Phase wird noch dreimal mit Phenol reextrahiert und gefällt. Die Homogenität der Bande wird in einem TBE-Testgel überprüft.

Polyacrylamidgele
(Maxam 1980)

Einzelstrange von DNA Fragmenten (z.B. zum Sequenzieren nach dem Maxam & Gilbert-Protokoll) konnen in einer Elektrophorese

in einem 5% w/v Polyacrylamidgel (Acrylamid:BIS = 50:1 in 0,5x TBE) aufgetrennt werden. Hierfür werden DNA Pellets in denaturierendem Probenpuffer aufgenommen (30% v/v DMSO, 1mM EDTA, 0,05% w/v Bromphenolblau und Xylencyanol), hitzedenaturiert auf ein vertikales Gel aufgetragen und mit 0,5x TBE als Laufpuffer eine empirisch zu bestimmende Zeit der Elektrophorese unterworfen. Nach dem Lauf wird die Lage der erwünschten Banden durch Ethidiumbromidinterkalation bzw. durch Filmschwärzung bestimmt. Die Banden werden ausgeschnitten, über Nacht bei 37°C in 0,5M Ammoniumacetat, 0,5% w/v SDS, 1mM EDTA eluiert und die DNA wird gefällt.

4.2.5.5. Radioaktive Markierung von DNA

DNA wurde entweder durch den Einbau von α-^{32}P-dNTP oder von α-^{35}S-dNTP radioaktiv markiert.

Nicktranslation
(Rigby 1977)

Nicktranslation bietet die Möglichkeit DNA mit einer hohen spezifischen Radioaktivität zu markieren, die wiederum notwendig ist zur Feststellung von Einzelkopien in Northern- oder Southern-Hybridisierungen.

Ein typischer Reaktionsansatz (20ul) hat folgende Zusammensetzung: 100ng DNA, 50mM Tris-HCl pH 7,5, 10mM $MgCl_2$, 10mM ß-Mercaptoathanol, 50ug/ml bovines Serumalbumin, 10-20uCi/ul ^{32}P-dNTP einer spezifischen Aktivitat von 3000Ci/mmol, je 10uM dNTP's mit Ausnahme derer, die als radioaktiv eingesetzt werden, 1ng/ml DNase I und 0,4 U/ul endonukleasefreie DNA-Polymerase I. Nach einer einstündigen Inkubation bei 14°C wird die Reaktion mit EDTA (50mM) gestoppt und die nicht inkorporierten Nukleotide werden mit Hilfe einer Sephadex G-50 - Säule abgetrennt. Mit diesem Protokoll erhalt man > $1x10^8$ cpm/ug

eingesetzter DNA.

Auffüllreaktion
(Drouin 1980)

Diese Möglichkeit wurde hauptsächlich für die Sequenzierreaktionen nach Maxam & Gilbert verwendet. Dabei werden versetzte Schnittstellen (5'überhängende Enden) der Restriktionsenzyme mit radioaktiven Nukleotiden in einer Reaktion mit Klenow-Polymerase (15 Minuten bei 20°C) markiert. Anschließend werden diese Enden mit einer Mischung an nicht radioaktiven Nukleotiden (10uM dNTP) aufgefüllt (15 Minuten bei 20°C), so daß nun glatte Enden an der Markierungsstelle vorliegen. Nicht inkorporierte Nukleotide werden ebenfalls durch Zentrifugation über eine Sephadex G-50 - Säule entfernt.

Markierung während der Synthese des Komplementärstranges
Diese Art der radioaktiven Markierung wurde einerseits während der cDNA Reaktion, anderseits bei der Sequenzierung nach Sanger eingesetzt und ist in den jeweiligen Kapiteln beschrieben.

4.2.5.6. DNA Transfer und DNA Immobilisierung auf Nitrozellulose
Nachfolgende Methoden werden verwendet, um in einem DNA-Gemisch, welches auf Nitrozellulosefilter fixiert vorliegt, komplementäre Sequenzen zu einer radioaktiv markierten Probe zu identifizieren.

DNA "Dots"
Test-DNA (Menge richtet sich nach der Fragestellung) wird zunächst mit Restriktionsenzymen gespalten. Ohne jegliche Zusatzbehandlung werden die DNA-Fragmente mit NaOH gleich denaturiert (NaOH ad 0,3N, eine Stunde bei Raumtemperatur

inkubieren) und anschließend unter Zugabe von Ammoniumacetat ad 2M neutralisiert. Dieses Gemisch wird nun punktförmig in kleinsten Volumina (1,5 - 2,0ul) auf trockene, unbehandelte Nitrozellulosefilter aufgetragen, welche auf Papierhandtuchern liegen, damit die Flüssigkeit sofort abgesaugt werden kann. Sobald die Filter trocken sind, werden sie zwei Stunden lang bei 80°C unter Vakuum gebacken.

"Southern-Blotting"
(Southern 1975)

In diesem Fall wird die mit Restriktionsenzymen gespaltene DNA (10ug bei chromosomaler DNA oder ca 50ng/Fragment) zuerst auf einem Agarosegel aufgetrennt, um später eine Aussage über die Größe des hybridisierenden Fragments machen zu können.
Nach Beendigung der Elektrophorese wird das mit Ethidiumbromid angefärbte Gel unter UV Licht mit angelegtem Längenstandard fotografiert. Anschließend erfolgt eine 15 minütige Inkubation in 0,2N HCl. Die damit bewirkte leichte Depurinierung der DNA soll einen effektiveren Transfer von hochmolekularen Fragmenten ermöglichen. Demzufolge entfällt dieser Schritt, wenn nur kleine DNA Fragmente (< 1000bp) transferiert werden sollen. Während weiterer 40 Minuten wird in 0,5N NaOH, 1,5M NaCl denaturiert und anschließend mit 0,5M Tris-HCl pH 7,4, 3M NaCl 40 Minuten lang neutralisiert. Zwischen diesen Schritten wird das Gel gründlich mit H_2O gespült.
Für den nun folgenden Transfer wird das Agarosegel auf eine Glasplatte mit festem saugfähigem Papier (z.B. 3MM Whatman) gelegt, welches in ein Vorratsgefäß mit 20x SSC eintaucht. Auf das Gel kommt die zurechtgeschnittene, mit 2xSSC getrankte Nitrozellulose und ein Stapel von saugfähigem Papier. Ein zusätzliches Gewicht gewährleistet einen gleichmäßig

konstanten Druck während des Transfers.

Enthält das Gel chromosomale DNA, so erfolgt der Transfer über Nacht, um auch für große DNA Fragmente effizient zu sein. Bei klonierter DNA können von einem Gel Mehrfachblots angefertigt werden, da ng-Mengen an DNA für ein positives Signal genügen. Hierbei wird eine Reihenfolge folgender Transferzeiten eingehalten: 20, 10, 30 und 60 Minuten. Nach Beendigung des Transfers werden die NC-Filter in 6xSSC getaucht, luftgetrocknet und die DNA wird zwei Stunden bei 80°C unter Vakuum fixiert.

4.2.5.7. DNA Hybridisierung
(Southern- und Dot-Hybridisierungen)

Die DNA Filter werden 2-4 Stunden in Hybridisierungslösung (50mM Kaliumphosphat pH 7,0, 5x SSC, 5x Denhardt's, 0,2% w/v SDS, 10ug/ml poly C, 10ug/ml poly T, 100ug/ml Lachssperma-DNA)bei 65°C inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Die spezifische Hybridisierung findet unter gleichen Bedingungen nach Zugabe der denaturierten (10 Minuten kochen, Eisschock) radioaktiv markierten Probe statt über Nacht statt. Die eingesetzte Radioaktivität bei chromosomalen Blots ist $1x10^4$ cpm/ml, bei Blots mit klonierter DNA $1x10^3$ cpm/ml. Anschließende Waschungen in 5xSSC, 3xSSC, 2xSSC und 1xSSC, mit jeweils 0,1% w/v SDS zur besseren Benetzung, bei 65°C, entfernen adhärierende, aber unspezifische Radioaktivität vom Filter. Durch Waschschritte mit immer weiter reduziertem Salzgehalt (0,1xSSC bis 0,03xSSC) und gleichzeitiger Überwachung mit einem Zählgerät wird versucht ein vernünftiges Verhältnis Signal über Hintergrund zu erzielen, welches nach einer Filmexponierung zu einem auswertbaren Ergebnis führt.

4.2.6. Proteinarbeiten

4.2.6.1. Biosynthetische Markierung von Zellen

Zellen werden mit serumfreiem Medium gewaschen und in Methionin-freiem Medium aufgenommen zu ca. $1x10^6$ Zellen/ml. Nach einer einstündigen Vorinkubation im Brutschrank bei Zellkulturbedingungen werden 75uCi/ml ^{35}S-L-Methionin zugegeben und weitere 12 Stunden inkubiert. Anschließend werden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und für die Immunpräzipitation lysiert.

4.2.6.2. Immunpräzipitation

Ungefähr $1x10^6$ biosynthetisch markierte Zellen werden in 500ul eiskaltem Lysepuffer (10mM Tris-HCl pH 7,3, 1mM $MgCl_2$, 1% v/v NP40, 0,1mM PMSF) während einer 10 minutigen Inkubation in Eis lysiert. Das Kernpellet wird verworfen, während der Überstand zu sequentiellen oder parallelen, mit Aliquoten durchgeführten, Immunpräzipitation verwendet wird. Präzipitiert wird während einer ein- bis vierstündigen Inkubation bei 4°C, mit monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern, welche an Sepharose Protein A gekoppelt wurden. Die Immunkomplexe werden 5x mit eiskaltem NET-Puffer (50mM Tris-HCl pH 7,5, 0,15mM NaCl, 5mM EDTA, 1% v/v NP40) gewaschen, wobei während den ersten beiden Waschungen noch zusätzlich 0,5M NaCl beigefügt werden. Anschließend werden die Immunkomplexe, auf 1- oder 2-dimensionalen Gelen analysiert.

4.2.6.3. Protein Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Isoelektrische Fokussierung
(Vasilov 1983)

Wurde zweidimensional analysiert, so erfolgte als erste Dimension die isoelektrische Fokussierung in 200ul Kapillaren mit

einem pH-Gradienten von 4 - 8 (Gellösung: 9,2M Harnstoff, 3,9% w/v Acrylamid, 0,2% w/v BIS, 2% v/v NP40, 0,8% Ampholite pH 5-7, 0,4% Ampholite pH 3,5-10). Die Antigene werden mit Hilfe von Probenpuffer (9,5M Harnstoff, 1,6% Ampholite pH 5-7, 0,4% Ampholite pH 3,5-10, 5% ß-Mercaptoathanol, 2% v/v NP40) aus dem Immunkomplex gelöst, und nach Abtrennung der Sepharose werden die Proben in die Kapillaren eingefüllt. Vor Pufferzugabe werden sie noch mit einer Lösung an 9,0M Harnstoff, 0,8% Ampholine pH 5-7 und 0,2% Ampholine pH 3,5-10 überschichtet. Als Anodenpuffer dient 20mM NaOH, als Kathodenpuffer 10mM Phosphorsäure. Die Elektrophorese wird mit 400 V/Röhrchen durchgeführt, und zwar nicht langer als 7500 Voltstunden, am Ende noch eine weitere Stunde lang bei 800 V.

SDS-PAGE
(Lammli 1970)

Zur Vorbereitung auf die zweite Dimension werden die IEF-Kapillargele ausgeblasen und zunächst eine Stunde lang in Äquilibrierungspuffer (62,5mM Tris-HCl pH 6,8, 2,4% w/v SDS, 10% v/v Glyzerin, 5% v/v ß-Mercaptoäthanol, 0,025% w/v Bromphenolblau) inkubiert. Die Kapillargele werden dann komplett auf ein 7,5 - 15% Polyacrylamidgel ohne Auftragstaschen aufgelegt, mit 1% w/v Agarose abgedichtet und die Elektrophorese wird bei 50 V über Nacht durchgeführt. Wird nach der Immunpräzipitation direkt ein SDS-Gel verwendet, so werden die Immunkomplexe von Protein A Sepharose durch Kochen (3 Minuten) in Probenpuffer (125mM Tris-HCl pH 6,8, 4,2% w/v SDS, 1,4M ß-Mercaptoäthanol, 20% v/v Glyzerin, Bromphenolblau) abgelost und auf einem SDS-Polyacrylamidgel (meistens 12,5%, Verhaltnis Acrylamid:BIS = 125:1) aufgetrennt. Anschließende Comassie-Farbung und Entfärbung der Gele wird nach Standardprotokollen

vorgenommen.

Sind die Proteinproben mit ^{35}S-L-Methionin markiert, so werden die Gele noch in einer Szintallationslosung (Enlightning™) inkubiert, welche die Signale dieses ß-Isotops während der anschließenden Filmexponierung bei -80°C verstärkt.

4.2.7. Klonieren von DNA

4.2.7.1. Klonieren von cDNA in pBR322

Annealing von cDNA (dC-getailt) und pBR322 (dG-getailt)

Zum Annealing werden überschlagsmäßig äquimolare Mengen an getailtem Vektor- und cDNA-Enden eingesetzt. Diese werden in TEN-Puffer (10mM Tris-HCl pH 7,4, 0,5mM EDTA, 100mM NaCl) ad 0,1ng/ul beziehungsweise 2ng/ul verdünnt, gemischt und stufenweise zunächst 5 Minuten bei 65°C, 120 Minuten bei 50°C und 5 Minuten bei 46°C inkubiert. Dann wird das letzte Wasserbad abgeschaltet und die Proben werden langsam über Nacht abgekühlt. Anschließend wird die DNA gefällt und für die Transformation in H_2O aufgenommen. Eine kovalente Verbindung von Vektor-DNA und cDNA ist nicht notwendig, da die dG:dC Brücken für stabile Konstrukte sorgen.

Kompetenzinduktion beim E.coli Stamm C600

Ausgehend von einer Kolonie wird in 5ml LB-Medium über Nacht eine gesättigte Bakterienkultur herangezogen. Davon wird eine 1:100 Verdünnung angesetzt und bei 37°C geschüttelt, bis die photometrische Bestimmung bei 650nm den Wert 0,260 erreicht. In dieser logarithmischen Wachstumsphase werden die Bakterien abzentrifugiert (10 min 4000xg) und anschließend in 1/8 Ausgangsvolumen eiskalter $CaCl_2$-Lösung (100mM $CaCl_2$ in 20mM Hepes-puffer pH 7,4) resuspendiert. Nach einer Inkubation von

20 Minuten auf Eis wird wieder abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 1/100 Ausgangsvolumen eiskalter $CaCl_2$-Lösung resuspendiert.

Transformation mit pBR322
(Dagert 1979)

Vor der spezifischen Transformation mit der Versuchs-DNA wird die Kompetenz der Zellen durch eine Transformation mit dem Vektor getestet. Dieser Vortest bietet sich an, da die Kompetenz der Bakterien durch Lagerung bei 4°C bis zum Zeitpunkt 24 Stunden nach der Induktion etwa 3 - 4 fach zunimmt (bis auf 5-10x10^6 Kolonien/ug supercoiled pBR322). Für die Transformation werden 100ul kompetente Zellen mit 10ul DNA (=100ng) gemischt und wie folgt behandelt: 1 Stunde in Eis, dann Hitzeschock durch 5 Minuten bei 37°C und wieder 30 Minuten in Eis. Nach Zugabe von 2ml LB-Medium wird noch einmal 1 Stunde bei 37°C inkubiert und dann sofort ein berechnetes Aliquot auf LB-PLatten ausgestrichen, welche Antibiotika zur Selektion der Transformanten enthalten.

Selektion von Transformanten mit rekombinanter DNA

Der Vektor pBR322 enthält Gene, welche die Transformanten zum Wachstum in Tetracyclin- und Ampicillin-haltigem Medium befähigt. Durch Insertion von Fremd-DNA in die Pst I - Schnittstelle des Vektors wird die Ampicillinresistenz zerstört. Falsch-Positive werden dadurch praktisch eliminiert, daß der Hintergrund der Transformation kontrolliert wird. So ergab eine Transformation mit getailtem Vektor ohne Fremd-DNA nur 25 Kolonien/ug DNA, d.h. der Hintergrund ist <0,01%.

Kolonienfixierung auf Nitrozellulose
(Grunstein 1975)

Auf sterile Nitrozellulose wird ein Abklatsch der Transformanten mit rekombinanter DNA gemacht. Die weitere Behandlung der Filter erfolgt auf Whatman 3MM Papier, welches in den jeweiligen Puffern getränkt wird. Die Bakterien werden während einer 30minütigen Inkubation bei 4°C in Lysozym-Puffer (1,5mg/ml Lysozym in 50mM Tris-HCl pH 8,0, 25% w/v Saccharose) aufgeschlossen. Denaturierung erfolgt in zwei Schritten von je 10 Minuten: zuerst in 0,5M NaOH mit 0,2% v/v Triton X100, dann nur in NaOH. Neutralisiert wird ebenso bei Raumtemperatur für 10 Minuten, einmal in 1M Tris-HCl pH 7,5, 0,15M NaCl und dann in 0,5M Tris-HCl pH 7,5, 0,15M NaCl. Schließlich wird noch kurz in 2x SSC inkubiert und mit Athanol unter Vakuum gewaschen. Nach Lufttrocknung werden die Nitrozellulosefilter wie beschrieben zwei Stunden bei 80°C unter Vakuum gebacken. Nach Fixierung auf diese Weise kann mindestens 5x hybridisiert werden, ohne daß zuviel fixiertes Material verloren geht.

4.2.7.2. Subklonieren im M13-Phagen
(Messing 1977, 1982)

Ligation von Restriktionsfragmenten mit Vektor-DNA

Zum Sequenzieren mit der Dideoxy-Methode nach Sanger werden ds DNA Fragmente (200-600bp) in dsPhagen DNA (replikative Form der mp8, mp10, mp11 Vektoren) insertiert, wobei Versuchs- und Vektor DNA mit Restriktionsenzymen gespalten werden, welche entweder kompatible uberstehende oder glatte Enden generieren. Die kovalente Kopplung der Enden erfolgt enzymatisch mit der T4 DNA-Ligase in folgendem Reaktionsansatz: 50ng Test-DNA, 10ng Vektor-DNA, in 10mM Tris-HCl pH 7,5, 50mM NaCl, 10mM $MgCl_2$, 1mM ATP, 5mM DTT, Enzym 0,01 U/ul. Die Inkubation

findet in einem 14°C Wasserbad mindestens 4 Stunden lang statt. Bei glatten Enden wird mehr Enzym zugegeben (0,04 U/ul) und länger inkubiert (24 Stunden bei 4 - 6°C).

Kompetenzinduktion beim E.coli Stamm JM101

Von einer gesättigten Bakterienkultur wird eine 1:100 Verdünnung in 2xTY-Medium angesetzt und bis zu einer Dichte von A_{550}=0,25 gezogen. Anschließend werden die Bakterien abgekühlt und abzentrifugiert. Resuspendiert wird das Pellet in einem halben Ausgangsvolumen an eiskalter 50mM $CaCl_2$-Lösung und 20 Minuten lang auf Eis gegeben. Nach erneuter Zentrifugation werden die Bakterien in 1/10 Volumen der gleichen eiskalten Lösung aufgenommen. Auch bei diesem Stamm nimmt die Kompetenz innerhalb der nächsten 24 Stunden zu, wenn er bei 4°C gelagert wird.

Transformation mit M13-Phagen

250ul der kompetenten Zellen werden mit 5ul Ligationsansatz (50ng Versuchs-DNA, 10ng Vektor) gemischt und 40 Minuten in Eis inkubiert. Ein Hitzeschock erfolgt während 3 Minuten bei 42°C. Anschließend werden die Bakterien bis zum Ausplattieren wieder auf Eis gestellt. 250ul einer Mischung mit frischen JM101 Zellen (Mischung = 6ml einer 1:100 Verdünnung an Bakterien, 1 Stunde bei 37°C geschüttelt, frisch angesetzte 900ul X-gal (20mg/ml in Dimethylformamid) und 600ul IPTG (24mg/ml)) werden mit 3ml flüssigem Top-Agar (42°C) gemixt und zusammen mit dem Transformationsansatz auf H-Agarplatten gegossen.

Selektion von Transformanten mit rekombinanter DNA

Adulte M13-Phagen werden von den Bakterienzellen sezerniert und können benachbarte, nicht transformierte Zellen aus dem

Top-Agar befallen, welche dadurch im Wachstum retardiert werden. So entstehen durchsichtige Plaques, die sich vom truben Bakterienrasen abheben. Die Unterscheidung zwischen Transformanten mit oder ohne insertierter Test-DNA wird mit Hilfe eines Farbtests durchgeführt, basierend auf der ß-Galaktosidase Reaktion. Die verwendeten Vektoren sind so konstruirt, daß bei Anwesenheit des Induktors IPTG im Medium ein funktionsfähiges Enzym synthetisiert wird, welches das Substrat X-gal hydrolysiert, mit dem Ergebnis einer blauen Indikatorreaktion (Indolderivat). Enthält der Vektor Fremd-DNA, so kann keine funktionierende ß-Galaktosidase synthetisiert werden. Daher enthalten die farblosen Plaques rekombinante DNA, während blaue Plaques mit dem M13-Vektor allein transformiert wurden.

4.2.8. Sequenzieren von DNA

4.2.8.1. Didesoxy-Methode (Sanger 1977)

Zunächst wird ein einzelsträngiger Universalprimer (17bp, bindet an den Vektor kurz vor der Linker-Sequenz, in die insertiert wurde) während einer zweistündigen Inkubation bei 60°C an einzelsträngige DNA (in den M13-Vektoren mp8, mp10 bzw. mp11) annealed. Der Reaktionsansatz enthält ca. 100ng ssDNA, 1,2ng Primer, in 15mM Tris-HCl pH 8,0, 7,5mM $MgCl_2$. Anschließend werden zu diesem Ansatz 15uCi ^{35}S-dATP und 1 U Klenow-Polymerase pipettiert und jeweils 2,5 ul davon in ein Eppendorfgefäß gegeben, welches 2ul eines Nukleotidgemisches enthält, mit definierten Verhaltnissen an dNTP/ddNTP für die vier basenspezifischen Reaktionen:

A-Reaktion: dATP:ddATP = 3,2uM:50uM

C-Reaktion: dCTP:ddCTP = 4,0uM:16uM

G-Reaktion: dGTP:ddGTP = 4,0uM:50uM

T-Reaktion: dTTP:ddTTP = 4,0uM:250uM

Die nicht kompetitiven dNTPs sind zu je 80uM vertreten. Die Verhaltnisse von Desoxy- zu Didesoxy-Nukleotiden sind so gewahlt, daß sowohl die ersten als auch weitere 400 - 500 Basen des synthetisierten Komplemetarstrangs gelesen werden konnen.

Die Reaktion erfolgt bei 20°C 20 Minuten lang. Eine Chase-Reaktion wahrend weiterer 15 Minuten mit einem dNTP-Gemisch (ad 0,15mM) schließt sich an. Gestoppt wird durch Zugabe von 4ul Probenpuffer (20mmM EDTA in deionisiertem Formamid, 0,03% w/v Bromphenolblau und Xylencyanol).

4.2.8.2. Maxam-Gilbert Protokoll (Maxam 1980)

Restriktionsfragmente, welche durch Auffullreaktion mit ^{32}P-dNTP radioaktiv markiert wurden, werden elektrophoretisch in Einzelstränge aufgetrennt (siehe Kapitel: Isolieren von DNA Fragmenten). Von dem markierten Restriktionsschnitt aus wird sequenziert. Durch spezifische, jedoch partielle chemische Veranderung von einer oder gleichzeitig von zwei bestimmten Basen, mit anschließender Induktion von Strangbruchen an eben diesen Modifikationsstellen, kann die Basenreihenfolge einer DNA-Sequenz bestimmt werden. Für die Sequenzierung im vorliegenden Fall wurden folgende Spaltreaktionen durchgeführt: Guanin allein (G), Guanin und Adenin (G+A), Cytosin allein (C), sowie Cytosin und Thymidin (C+T). Die Vorgehensweise im einzelnen entspricht den Originalprotokollen (Ausnahme: 2 Veranderungen) und eine zusammenfassende Aufstellung kann

folgender Tabelle entnommen werden, die aus Maniatis et al. (1982) stammt.

SUMMARY OF BASE-SPECIFIC REACTIONS FOR SEQUENCING END-LABELED DNA

	G	G & A	T & C	C
Mix	200 µl DMS buffer	10 µl H_2O	10 µl H_2O	15 µl 5 M NaCl
	5 µl [^{32}P]DNA	10 µl [^{32}P]DNA	10 µl [^{32}P]DNA	5 µl [^{32}P]DNA
Chill to	0°C	0°C	0°C	0°C
Add	1 µl DMS	50 µl formic acid	30 µl HZ	30 µl HZ
Incubate	2,5 20°C, [illegible] min.	4 20°C, 5 min.	20°C, 5 min.	20°C, 5 min.
Add	50 µl DMS stop 750 µl ethanol	180 µl HZ stop 750 µl ethanol	200 µl HZ stop 750 µl ethanol	200 µl HZ stop 750 µl ethanol
Store	-70°C, 10–15 min.	-70°C, 10–15 min.	-70°C, 10–15 min.	-70°C, 10–15 min.
Centrifuge	10 min.	10 min.	10 min.	10 min.
To pellet add	250 µl 0.3 M NaAc 750 µl ethanol	250 µl 0.3 M NaAc 750 µl ethanol	250 µl 0.3 M NaAc 750 µl ethanol	250 µl 0.3 M NaAc 750 µl ethanol
Store	-70°C, 10–15 min.	-70°C, 10–15 min.	-70°C, 10–15 min.	-70°C, 10–15 min.
Centrifuge	10 min.	10 min.	10 min.	10 min.
Rinse pellet with	70% ethanol	70% ethanol	70% ethanol	70% ethanol
Vacuum dry				
To pellet add	100 µl 1.0 M piperidine	100 µl 1.0 M piperidine	100 µl 1.0 M piperidine	100 µl 1.0 M piperidine
Heat to	90°C, 30 min.	90°C, 30 min.	90°C, 30 min.	90°C, 30 min.
Lyophilize				
Add	10 µl H_2O	10 µl H_2O	10 µl H_2O	10 µl H_2O
Lyophilize				
Add	10 µl H_2O	10 µl H_2O	10 µl H_2O	10 µl H_2O
Lyophilize				
Add	10 µl loading buffer	10 µl loading buffer	10 µl loading buffer	10 µl loading buffer
Vortex				
Heat to	90°C, 1 min.	90°C, 1 min.	90°C, 1 min.	90°C, 1 min.
Chill in ice				
Load onto gel				

Reactions should be carried out in siliconized Eppendorf tubes.

4.2.8.3. Sequenziergele (Garoff 1981)

Die Auftrennung der Sequenzieransatze erfolgt auf denaturierenden Polyacrylamidgelen. Nach einem Vorlauf von einer halben Stunde (1500 V) werden die hitzedenaturierten (3 Minuten kochen) Proben aufgetragen und bei 2000 V gefahren.

Die Elektrophorese wurde fast ausschließlich auf 6% w/v Acrylamidgelen (7M Harnstoff, Acrylamid:BIS = 30:1 in 1xTBE) vorgenommen, welche die Abmessungen 40cmx20cmx0,2mm hatten.

Silikonisierung einer Glasplatte und Silanisierung der anderen bewirkt das Adhärieren des 0,2mm dicken Gels auf der silanisierten Fläche.

Durch eine 15 minütige Inkubation in 10% v/v Essigsäure wird fixiert; nach gründlicher Spülung mit Wasser wird das Gel bei 60°C auf der Glasplatte getrocknet und schließlich mit einem Röntgenfilm 1-2 Tage bei Raumtemperatur exponiert.

Durch unterschiedliche Lauflängen von einem Reaktionsset (entspricht den 4 basenspezifischen Reaktionen), und zwar: 1, 2 1/2, 3 1/2 und 5 Stunden, konnten mit Gelen dieser Größe von einem Ansatz 400 Basen gelesen werden. Während die Sequenzierreaktionen nach dem Maxam-Gilbert Protokoll interne Kontrollen erlauben, wird die Lesung der Didesoxyreaktionen durch die absolute Lage der Bande bestimmt. Um diese zu optimieren, werden Thermostatplatten benutzt, welche eine Elektrophorese mit konstanter Temperaturverteilung von vorgegebenen 52°C ermöglicht. Zur Absicherung werden auch die Komplementärstränge sequenziert.

LITERATURVERZEICHNIS

ALBERT, E.D., Baur, M.P. & Mayr, W.R. (Hrsg.) (1984) Histocompatibility Testing 1984. (Berlin, Springer Verlag)

ALBERT, E. & Mayr, W. (1985) Brief summary of the ninth International Histocompatibility workshop. Tissue Antigens 25: 3-10

AMOR, M., Tosi, M., Duponchel, C., Steinmetz, M. & Meot, T. (1985) Liver mRNA Probes disclose two cytochrome P-450 genes duplicated in tandem with the complement C4 loci of the mouse H-2S region. PNAS 82: 4453-4457

ARCEZ-GOMEZ, B., Jones, E.A., Barnstable, C.J., Solomon, E. & Bodmer, W.F. (1978) The genetic control of HLA-A and -B antigens in somatic hybrid cells: requirement for β_2-microglobulin. Tissue Antigens 11: 96-112

APPLEYARD, R.K. (1954) Seggregation of new lysogenic types during growth of a double lysogenic strain derived from Escherichia coli K12. Genetics 39: 440-452

ARNOT, D., Lillie, J.W., Auffrey, C., Kappes, D. & Strominger, J.L. (1984) Inter-locus and intra-allelic polymorphisms of HLA class I antigen gene mRNA. Immunogenetics 20: 237-252

AVIV, H. & Leder, P. (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 1408-1412

BAILEY, J.M. & Davidson, N. (1976) Methylmercury as a reversible denaturing agent for agarose gel electrophoresis. Anal. Biochem. 70: 75-78

BERGER, S.L. & Birkenmeier, C.S. (1979) Inhibition of intractable nucleases with ribonucleoside-vanadyl complexes: isolation of messenger ribonucleic acid from resting lymphocytes. Biochemistry 18: 5143-5149

BIRO, P.A., Pan, J., Sood, A.K., Kole, R., Reddy, V.B. & Weissman, S.H. (1983) Sequences of human repetitive DNA, non-α-globin genes, and major hisocompatibility locus genes: III. the major hisocompatibility complex. In: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47: 1082-1086 (Cold Spring Harbor NY)

BIRO, P.A., Duceman, B.W., Srivastana, R., Pan, J., Sood, A. & Weissman, S.M. (1985) Complete nucleotide sequence of the class I HLA genes A2 and B7: comparison with other HLA sequences. eingereichtes Manuskript

BODMER, W.F. (1972) Evolutionary significance of the HL-A system. Nature 237: 139-145

BODMER, W.F. (1984) The major histocompatibility system: structure and function summary and synthesis. In: Yamamura, Y. & Tada, T. (Hrsg.) "Progress in Immunology V. Fifth international congress of immunology", S. 959-970 (Acad. Press Japan Inc.)

BOLIVAR, F. & Backman, K. (1979) Plasmids of Escherichia coli as cloning vectors. Methods Enzymol. 68: 245-280

BREGEGERE, F. (1983) A directional process of gene conversion is expected to yield dynamic polymorphism associated with stability of alternative alleles in class I histocompatibility antigens gene family. Biochimie 65: 229-237

BREUNING, M.H., Lucas, C.J., Breur, B.S., Engelsma, M.Y., de Lange, G.G., Dekker, A.J., Biddison, W.E. & Ivanyi, P. (1982) Subtypes of HLA-B27 detected by cytotoxic T-lymphocytes and their role in self recognition. Human Immunol. 5: 259-268

BREWERTON, D.A., Caffrey, M., Nicholls, A., Walters, D. & James, D.C.O. (1973) Acute anterior uveitis and HLA-B27. Lancet ii: 994-996

BRODSKY, F.M., Parham, P., Barnstable, C.J., Crumpton, M.J. & Bodmer, W.F. (1979) Monoclonal antibodies for analysis of the HLA system. Immunol. Rev. 47: 3-61

CAFFREY, M.F.P. & James, D.C.O. (1973) Human lymphocyte antigen association in ankylosing spondylitis. Nature 242: 121

CAMI, B., Bregegere, F., Abastado, J.P. & Kourilsky, P. (1981) Multiple sequences related to classical histocompatibility antigens in the mouse genome. Nature 291: 673-675

CAVALLI-SFORZA, L.L. (1969) In: "Proc. 12th Int. Cong. Genet. Tokyo (Science Council of Japan) 3: 405-416

CHARRON, D.J. & McDevitt, H.O. (1979) Analysis of HLA-D region associated molecules with monoclonal antibody. PNAS 76: 6567-6571

CLAAS, F.H.J., Runia van Niewkoop, R., van den Berge, W. & van Rood, J.J. (1982) Interactions of penicillin with HLA-A and -B antigens. Human Immunol. 5: 83-90

CURTONI, E.S., Mattius, P.L. & Tosi, R.M. (Hrsg.) (1967) Histocompatibility Testing 1967. (Munksgaard, Copenhagen)

CUSHLEY, W. & Owen, M.J. (1983) Structural and genetic similiarities between immunoglobulins and class I histocompatibility antigens. Immunol. today 4: 88-92

DAGERT, M. & Ehrlich, S.D (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. Gene 6: 23-28

DICKMEISS, E., Sdeberg, B.& Svejgaard, A. (1977) Human cell-mediated cytotoxity against modified target cells is restricted by HLA. Nature 270: 526-528

DROUIN, J. (1980) Cloning of human mitochondrial DNA in Escherichia coli. J. Mol. Biol. 140: 15-34

EBRINGER, A. (1978) The crosstolerance hypothesis in immunogenetic (IR-gene) systems and in rheumatic fever and ankylosing spondylitis. In: Dumonde, M. (Hrsg.) Research into

rheumatoid arthritis and allied diseases. (MTP Press, Lancaster)

EBRINGER, A. (1983) The crosstolerance hypothesis, HLA-B27 and ankylosing spondylitis. Brit. J. Rheumatol. 22: 53-66

EBRINGER, A., Baines, M. & Ptaszynska, T. (1985) Spondyloarthritis, uveitis, HLA-B27 and Klebsiella. Immunol. Rev. 86: 101-116

EDIDIN, M. (1983) MHC antigens and non-immune functions. Immunol. today 4: 269-270

EDMONDS, J., Bashir, H., Thomson, G. & Carbonara, A.O. (1984) HLA-B27-negative ankylosing spondylitis. In: Albert, E.D., Baur, M.P. & Mayr, W.R. (Hrsg.) Histocompatibility testing 1984. (Springer Verlag, Berlin)

EZQUERRA, A., Bragado, R., Vega, M.A., Strominger, J.L., Woody, J. & Lopez de Castro, J.A. (1985) Primary structure of papain-solubilized human histocompatibility antigen HLA-B27. Biochemistry 24: 1733-1741

FERRONE, S., Allison, J.P. & Pellegrino, M.A. (1978) Human DR (Ia-like) antigens: Biological and molecular profile. In: Inman, F. & Reisfeld, R.A. (Hrsg.): Cotemporary topics in Molecular Immunology 7: 239-281 (Plenum Press NY)

GAROFF, H. & Ansorge, W. (1981) Improvement of DNA sequencing gels. Anal. Biochem. 115: 450-457

GATTI, R. A. & Leibold, W. (1979) HLA-D typing with lymphoblastoid cell lines IV. Allelic Relationships. Tissue Antigens 13: 35-44

GENTH, E. (1985) Klinische Nosologie und Pathogenese HLA-B27 assoziierter Arthropathien. medwelt 36: 297-303

GECZY, A.F., Alexander, K., Bashir, H.V. & Edmonds, J. (1980) A factor in Klebsiella cultuer filtrates specifically modifies an HLA-B27-associated cell surface component. Nature 283: 782-784

GECZY, A.F., Alexander, K., Bashir, H.V., Edmonds, J.P., Upfold, L. & Sullivan, J. (1983) HLA-B27, Klebsiella and ankylosing spondylitis: biological and clinical studies. Immunol. Rev. 70: 23-49

GODING, J.W. (1981) Evidence for linkage of murine β_2-microglobuline to H-3 and Ly-4. J. Immunol. 126:1644-1666

GOTZE, D. (Hrsg.) (1977) The major histocompatibility system in man and animals. (Springer Verlag, Berlin)

GOODFELLOW, P.N., Jones, E.A., van Heyningen, V., Solomon, E., Bobrow, M., Miggiano, V. & Bodmer, W.F. (1975) The β_2-microglobuline gene is on chromosome 15 and not in the HLA region. Nature 254: 267-269

GORER,, P.A., Lyman, S. & Snell, G.O. (1948) Proc. r. soc. London SER B. 135: 499-505

GORER, P.A. (1937) The genetic and antigenic basis of tumor transplantation. J. Pathol. Bacteriol. 44: 691-697

GOULMY, E., Termijtelen, A., Bradley, B.A. & van Rood, J.J. (1977) Y-antigen killing by T-cells of women is restricted by HLA. Nature 266: 544-545

GREY, H.M., Kubo, R.T., Colon, S.M., Poulik, M.D., Cresswell, P., Springer, T., Turner, M. & Strominger, J.L. (1973) The small subunit of HLA antigens is β_2-microglobuline. J. Exp. Med. 138: 1608-1612

GRUMET, F.C., Fendly, B.M., Fish, L. Foung, S. & Engleman, E.G. (1982) Monoclonal antibody (B27 M2) subdividing HLA-B27. Human Immunol. 5: 61-72

GRUNSTEIN, M. & Hogness, D. (1975) Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. PNAS 72: 3961-3965

GUILD, B.C. & Strominger, J.L. (1984) Human and murine class I MHC antigens share conserved serine 335, the site of HLA phosphorylation in vivo. J. Biol. Chem. 259: 9235-9240

HAMMERLING, G.J., Rüsch, E., Tade, N., Kimura, S. & Hammerling, L. (1982) Localization of allodeterminants on H-2K^{b} antigens determined with monoclonal antibodies and H-2 mutant mice. PNAS 79: 4737-4741

HALDANE, J.B.S. (1955) The estimation and significance of the logarithm of a ratio of frequencies. Ann. Hum. Genet. 20: 309-311

HELENIUS, A., Morein, B., Fries, E., Simons, K., Robinson, P., Schirrmacher, C., Terhorst, C. & Strominger, J.L. (1978) Human (HLA-A and HLA-B) and murine (H-2K and H-2D) histocompatibility antigens are cell surface receptors for Semliki forest virus. PNAS 75: 3846- 3850

HILDEMANN, W.H., Johnson, I. & Jokd, P.L. (1979) Immunocompetence in the lowest metazoar phylum: Transplantation immunity in sponges. Science 204: 420-442

HOOD, L., Steinmetz, M. & Malissen, B. (1983) Genes of the major histocompatibility complex of the mouse. Annual Rev. Immunol. 1: 529-568

ISH-HOROWICZ, D. & Burke, J.F. (1981) Rapid and efficient cosmid vector cloning. Nucl. Acid Res. 9: 2989-2998

JOERGENSON, Lamm, L.U. & Kissmeyer-Nielsen, (1973) Mixed lymphocyte cultures with inbred individuals: An approach to MLC-typing . Tissue Antigens 3: 323-339

JOHNSON, J. P., Demmer-Dieckmann, M. & Meo T. (1981) Surface antigens of human melanoma cells defined by monoclonal antibodies. Eur. J. Immunol.11:825-831

KIDD, K.K., Bernocco, D., Carbonara, A.O., Daneo, V., Steiger, U. & Ceppellini, R. (1977) Genetic analysis of HLA associated diseases: the "illness susceptible" gene frequency and sex ratios in ankylosing spondylitis. In: Dausset, J. & Svejgaard, A. (Hrsg.) "HLA and Disease", S. 72-80 (Munksgaard, Copenhagen)

KLEIN, J. (1975) Biology of the mouse histocompatibility complex. (Springer Verlag, Berlin)

KLEIN, J. (1979) The major histocompatibility complex of the mouse. Science 203: 516-521

KLEIN, J., Juretic, A., Baxenavis, C.N. & Nagy, Z.A. (1981a) The traditional and the new version of the mouse H-2 complex. Nature 291: 455-460

KLEIN, J. & Figueroa, F. (1981b) Polymorhism of the mouse H-2 loci. Immunol. Rev. 60: 23-57

KOLLER, B.H., Sidwell, B., DeMars R. & Orr, H.T. (1984) Isolation of HLA locus-specific DNA probes from the 3'untranslated region. PNAS 81: 5175-5178

KOLLER, B.H. & Orr, H.T. (1985) Cloning and complete sequence of an HLA-A2 gene: Analysis of two HLA-A alleles at the nucleotide level. J. Immunol. 134: 2727-2733

KRATZIN, H., Yang, C.Y., Gotz, H., Pauly, E., Kolbel, S., Egert, G., Thinnes, F.P., Wernet, P., Altevogt, P. & Hilschmann, N. (1981) Primarstruktur menschlicher Histokompatibilitatsantigene der Klasse II. I. Mitteilung: Aminosauresequenz der N-terminalen 198 Reste der ß-Kette des HLA-Dw2.2, DR2.2 Alloantigens. Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 362: 1655-1669

KRESS, M., Liu, W.Y., Jay, E., Khoury, G. & Jay, G. (1983) Comparison of class I (H-2) gene sequences. J. Biol. Chem. 258: 13929-13936

Kurnit, D.M. (1979) Evolution of sickle variant genes. Lancet i: 104

LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-686

LEHRACH, H., Diamond, D., Wozney, J.M. & Boedtker, H. (1977) RNA molecular weight determinations by gel elektrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. Biochemistry 16: 4743-4751

LEVI-STRAUSS, M. Tosi, M. Steinmetz, M. Klein, J. & Meo, T. (1985) Multiple duplications of complement C4 gene correlate with H-2-controlled testosterone-independent expression of its sex-limited isoform, C4 Slp. PNAS 82: 1746-1750

LOPEZ DE CASTRO, J.A., Bragado, R., Strong, D.M. & Strominger, J.L. (1983) Primary structure of papain-solubilized human histocompatibility antigen HLA-B40 (-Bw60). An outline of alloantigenic determinants. Biochemistry 22: 3961-3969

MALISSEN, M., Malissen, B. & Jordan, B.R. (1982) Exon/intron organization and complete nucleotide sequence of an HLA gene. PNAS 79: 893-897

MALOY, W.L. & Coligan J.E. (1982) Primary structure of the H-2D^{b} alloantigen. II. Additional amino acid sequence information, localisation of a third site of glycosylation and evidence for K and D region specific sequences. Immunogenetics 16: 11-25

MANIATIS, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (Hrsg.) (1982) Molecular cloning - A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)

MARCHE, P.N., Tykocinsky, M.L., Max, E.E. & Kindt, T.J. (1985) Structure of a functional rabbit class I MHC gene: similiarity to human class I genes. Immunogenetics 21: 71-82

MAXAM, A.M. & Gilbert, W. (1977) A new method for sequencing DNA. PNAS 74: 560-564

MAXAM, A.M. & Gilbert, W. (1980) Sequencing end labeled DNA with base specific chemical cleavage. Methods Enzymol. 65: 499

McCARTY jr., K. S., Vollmer, R. T. & McCarty, K. S. (1974) Improved computer program data for the resolution and fractionation of macromolecules by isokinetic sucrose density gradient sedimentation. Anal. Biochem. 61: 165-183

McDEVITT, H.O. (1979) Genetic structure and functions of the major histocompatibility complex. In:"Arthritis and allied conditions", McCarty, D.J. (Hrsg.) (Lea and Febiger, Philadelphia)

McDONELL, M.W., Simon, M.N. & Studier, W.F. (1977) Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. J. Mol. Biol. 110: 119-146

MEETING REPORT on the 4th HLA and H-2 cloning workshop, Stanford, California USA (1985)
#43 KRANGEL, M.S. Secretion of HLA-A and HLA-B antigens.
#81 DANSKA, J.S., Sibinga, N., Weissman, I.L. & McDevitt, H.O. Evolution of the histocompatibility complex: Cloning and analysis of the MHC related sequences in the colonial tunicate Botyryllus and the trout Salmo gairdneri.
#85 TRAVERS, P. & McDevitt, H.O. The origin of the vertebrate MHC.
#92 ENGLEHARD, V.H., Yanelli, J.R., Walk, S.F., Evans, G.A., Forman, J. & Horterman, M.J. Constructioon of novel class I histocompatibility antigens by interspecies exon shuffling.
#100 HORMAN, M.A., Walk, S.F. & Englehard, V.H. Site directed mutagenesis of the HLA-B7 molecule.
#108 VEGA, M.A., Asparicio, P., Rojo, S. & Lopez de Castro, J.A. Structure of HLA-B27 functional variants.
#125 WHITE, P.C., Werkmeister, New, M.I. & Dupont, B. Molecular genetics of the 21-hydroxylase deficiency.

MELLOR, A.L., Weiss, E.H., Rachmandran, K. & Flavell, R.A. (1983) A potential donor gene for the bm1 gene conversion effect in the C57 BL mouse. Nature 306: 792-795

MESSING, J. Gronenborn, B., Müller-Hill, B. & Hofschneider, P.H. (1977) Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle. Insertion of a nine II fragment of the lac regulatory region in the M13 replicative form in vitro. PNAS 74: 3642-3646

MESSING, J. (1979) A multipurpose cloning system based on the single stranded DNA bacteriophage M13. Recombinant DNA Technical Bulletin, NIH Publicaton No. 79-99, 2: 43-48

MESSING, J. & Vieira, J. (1982) A new pair of M13 vectors for selecting either strand of double-digest restricted fragments. Gene 19: 269-276

MIETTINEN, O.S. (1976) Estimability and estimation in case-referent studies. Amer. J. Epidemiol. 103: 226-235

MILLER, J. F. & Bolen, D. W. (1978) A Guanidin hydrochloride induced change in Ribonuclease without gross unfolding. Biochem. Biophys. Res. Commun. 81: 610-615

MOLDERS, H.H., Breuning, M.H., Ivanyi, P. & Ploegh, H.L. (1983) Biochemical analysis of variant HLA-B27 antigens. Human Immunol. 6: 111-117

MÖLLER, G. (Hrsg.) (1983) HLA and disease susceptibility. Immunol. Rev. 70 (Munksgaard, Copenhagen)

MÖLLER, G. (Hrsg.) (1985) Molecular genetics of class I and class II antigens. Immunol. Rev. 84 und 85 (Munksgaard, Copenhagen)

MORITA, T., Delarbre, C., Kress, M., Kourilsky, P. & Gachelin, G. (1985) An H-2K gene of the t^{w32} at the T/t complex is a close parent of an H-2K^{d} gene. Immunogenetics 21: 367-383

N'GUYEN, C., Sodoyer, R., Trucy, J., Strachan, T. & Jordan, B.R. (1985) The HLA-Aw24 gene: sequence, surroundings and comparison with the HLA-A2 and HLA-A3 genes. Immunogenetics 21: 479-489

ORR, H. & DeMars, R. (1983) Class I-like HLA genes map telomeric to the HLA-A2 locus in human cells. Nature 302: 534-536

ORR, H.T., Lopez de Castro, J.A., Parham, P., Ploegh, H.L. & Strominger, J.L. (1979) Comparison of amino acid sequences of two human histocompatibility antigens HLA-A2 and HLA-B7: location of putative alloantigenic sites. PNAS 76: 4395-4399

PARKER, C.W. (Hrsg.) (1980) Clinical Immunology. (W.B. Saunders Co., Philadelphia)

PLOEGH, H.L., Orr, H.T. & Strominger, J.L. (1981) Major histocompatibility antigens: the human (HLA-A, -B, -C) and murine (H-2K, H-2D)class I molecules. Cell 24: 287-299

PLOEGH, H.L., Orr, H.T. & Strominger, J.L. (1980) Molecular cloning of a humman histocompatibility antigen cDNA fragment. PNAS 77: 6061-6085

PRENDERGAST, J.K., Sullivan, J.S., Geczy, A.F., Upfold, L.I., Edmonds, J.P. & Bashir, H.V. (1984) The enigma of the Klebsiella connection and ankylosing spondylitis: a commentary Hum. Immunol. 9: 131-136

RETZEL, E.F., Collet, M.S. & Faras, A.J. (1980) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid by the avian retrovirus reverse transcriptase in vitro: optimum conditions required for transcription of large ribonucleic acid templates. Biochemistry 19: 513-518

RIGBY, P.W.J., Dieckmann, M. Rhodes, C. & Berg, P. (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. 113: 237-251

SANGER, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. PNAS 74: 5463-5467

SASAZUKI, T., Kohno, Y., Iwamoto, I., Tanimura, M. & Naito, S. (1978) Association between an HLA haplotype and low responsiveness to tetanus toxoid in man. Nature 272: 359-361

SCHLOSSTEIN, L. (1973) High association of HLA antigen W27 with ankylosing spondylitis. New Engl. J. Med. 288: 703-706

SEED, B. (1982) Diazotizable acrylamine cellulose papers for the coupling and hybridization of nucleic acids. Nucleic Acid Res. 10: 1799-1810

SHER, B.T., Nairn, R., Coligan, J.E. & Hood, L.E. (1985) DNA sequence of the mouse H-2D^d transplantation antigen gene. PNAS 82: 1175-1179

SIGNAS, C., Katze, M.G., Perrson, H. & Philipson, L. (1983) An adenovirus glycoprotein binds heavy chains of class I transplantation antigens from man and mouse. Nature 299: 175-178

SNELL, G.D. (1968) H-2 locus of the mouse: observation and speculations concerning its comparative genetics and polymorphism. Folia biol. Praha 14: 335

SNELL, G.D., Dausset, J.L. & Nathenson, S.G. (1976) Histocompatibility (Acad. Press NY) S. 401

SODOYER, R., Damotte, M., Delovitch, T.L., Trucy, J., Jordan, B.R. & Strachan, T. (1984) Complete nucleotide sequence of a gene encoding a functional human class I histocompatibility antigen (HLA-Cw3). EMBO J. 3: 879-885

SOOD, A.K., Pereira, D. & Weissman, S.M. (1981) Isolation and partial nucleotide sequence of a cDNA clone for human histocompatibility antigen HLA-B by use of an oligodeoxynucleotide primer. PNAS 78: 616-620

SOUTHERN, E. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517

STEINMETZ, M., Winoto, A., Minard, & Hood, L. (1982) Cluster of genes encoding mouse transplantation antigens. Cell 28: 489-498

STEINMETZ, M. & Hood, L. (1983) Genes of the major histocompatibility complex in mouse and man. Science 222: 727- 733

STRACHAN, T., Sodoyer, R., Damotte, M. & Jordan, B.R. (1984) Complete nucleotide sequence of a functional class I gene, HLA-A3: implication for the evolution of HLA genes. EMBO J. 3: 887-894

STROHMAN, R. C., Moss, P. S., Micou-Eastwood, J., Spector, D., Przybyla, A., Paterson, B. (1977) Messenger RNA for myosin polypeptides: isolation from single myogenic cell cultures. Cell 10: 265-273

STROMINGER, J.L. (1980) Structure of products of the major histocompatibility complex in man and mouse. In: Dausset, J. & Fougereau, M. (Hrsg.) Immunology 1980; Progress in Immunology IV.: 530-540. (Academic Press London)

SVEJGAARD, A. & Ryder, L.P. (1976) Interaction of HLA molecules with non immunological ligands as an explanation of HLA and disease associations. Lancet ii: 547-549

SVEJGAARD, A., Platz, P. & Ryder, L.P. (1983) HLA and disease 1982 - a survey. Immunol. Rev. 70: 193-218

THOMAS, P.S. (1980) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. PNAS 77: 5201-5205

THOMSON, G. & Bodmer, W. (1977) The genetic analysis of HLA and disease associations. In: "HLA and disease", Dausset, J. & Svejgaard, A. (Hrsg.) (Munksgaard, Copenhagen)

THOMSON, G. (1981) A review of theoretical aspects of HLA and disease associations. Theor. Pop. Biol. 20: 168-208

THOMSON, G. (1982) The human histocompatibility system: anthropological considerations. Amer. J. Physiol. Anthrpol. 62: 81-89

TOUBERT, A., Gomard, E., Grumet, F.C., Amor, B., Muller, J.Y. & Levy, J.P. (1984) Identification of several functional subgroups of HLA-B27 by restriction of the activity of antiviral T-killer lymphocytes. Immunogenetics 20: 513-525

UPFOLD, L.I., Sullivan, J.S., Prendergast, J.K. & Geczy, A.F. (1985) HLA-B27: Speculations on the nature of its involvement in ankylosing spondylitis. In: "Immunobiology of HLA class I and class II molecules", de Vries, R.R.P. & van Rood, J.J. (Hrsg.), Progress in Allergy, Vol. 36 (Karger AG, Basel)

VALLE, G., Besley, J. & Colman, A. (1981) Synthesis and secretion of mouse immunoglobulin chain from Xenopus oocytes. Nature 291: 338-340

van ROOD, J.J. (1962) Leucocyte grouping. Doktorarbeit, Leiden

van SOMEREN, H., Westerveld, A., Hagemajer, A., Mees, J.R., Meera Khan, P. & Zaalberg, O.B. (1974) Human antigen and enzyme markers in man-chinese hamster somatic cell hybrids: evidence for synteny between the HLA-A, PGMe, ME1 and IPO-B loci. PNAS 71: 982-965

VASILOV, R.G., Hahn, A., Mölders, H., van Rood, J.J., Breuning, M.H. & ploegh, H.L. (1983) Analysis of human class I antigens by two dimensional gel electrophoresis. I. Polymorphism, evidence for additional (non-HLA-A,B,C) gene products, and identification of variant HLA-A,B antigens. Immunogenetics 17: 333-356

VEGA, M.A., Bragado, R., Ezquerra, A. & Lopez de Castro, J.A. (1984) Variability and conformation of the HLA class I antigens: a predictive approach to the spatial arrangement of polymorphic regions. Biochemistry 23: 823-831

WEISLANDER, L. (1979) A simple method to recover intact high molecular weight RNA and DNA after electrophoretic separation in low gelling temperature agarose gels. Anal. Biochem. 98: 305-309

WEISS, E.H., Golden, L., Fahrner, K., Mellor, A.L., Devlin, J.J., Buliman, H., Tiddens, H., Bud, H. & Flavell, R.A. (1984) Organisation and evolution of the class I gene family in the major histocompatibility complex of the C57 BL/10 mouse. Nature 310: 650-655

WILLIAMS, A.F. (1984) The immunoglobuline superfamily takes shape. Nature 308: 12-13

WOOLF, B. (1955) On estimating the relation betwwen blood group and disease. Ann. Eugenics 19: 251-253

YOUNG, C.R., Ebringer, A. & Archer, J.R. (1978) immune response inversion after hyperimmunisation. Possible mechanism in the pathogenesis of HLA-linked diseases. Ann. rheum. Dis. 37: 152-158

ZINKERNAGEL, R.M. & Doherty, P.C. (1974) Restriction of in vitro T-cell mediated cytotoxity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. Nature 248: 701-702

ZINKERNAGEL, R.M. & Doherty, P.C. (1979) MHC restricted cytotoxic T-cells: studies in the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cells restriction-specificity, function and responsiveness. Adv. Immunol. 27: 51-177

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN Seite

1 Organisation des MHC 12

2 Typischer Aufbau eines HLA Klasse I Gens 13

3 Schematische Darstellung der Struktur eines HLA Klasse I Antigens 15

4 Strukturhomologien bei Molekülen der Ig-Superfamilie 16

Tabelle 1 Beispiele einiger Krankheitsassoziationen mit HLA Antigenen 22

Tabelle 2 Assoziation von HLA-B27 mit A.S. in verschiedenen ethnischen Gruppen 26

5 Immunpräzipitierte HLA Klasse I Antigene aus biosynthetisch markierten Produkten der LG-2 Zelle 31

6 Größenfraktionierung von mRNA auf einem Saccharose-gradienten 33

7 Ethiumbromid angefärbte RNA nach Elektrophorese 35

8 Northern Hybridisierung 36

9 In vitro Translation von mRNA nach Hybridselektion 37

Tabelle 3 Effizienz der cDNA Reaktionen 40

10 ss und ds cDNA auf einem denaturierenden Agarosegel 41

Tabelle 4 Transformationseffizienz 44

11 Proben, die zur Identifizierung von HLAhaltigen cDNA Klonen verwendet wurden 45

12 Spezifität der Proben 1 und 2 in einem genomischen Southern 47

13 Signalwertung der Kolonienhybridisierung 48

Tabelle 5 Häufigkeit von HLA positiven Klonen 49

14 Fragmentierte Proben zur Analyse von Orientierung und Länge der HLA cDNA Klone 52

15 Grobe Restriktionskarten der HLA-A und HLA-B Klone 52

16 Strategie zur Sequenzierung 54

17 Partielle cDNA Sequenz von HLA-Cw1 (Klon pC1) 56

18 cDNA Sequenz von HLA-B27 59

19 Bekannte HLA Nukleotidsequenzen im Vergleich 61

Tabelle 6 Intra- und Inter-Locus - Homologien bei bei HLA Klasse I Molekülen 65

20 Peptidvergleich bekannter HLA Sequenzen 70

21 Plot-Darstellung der HLA Klasse I Variabilität 72

ABKÜRZUNGEN

A_x		: Absorption bei x nm
A.S.		: Ankylosierende Spondylitis
b		: Base einer (desoxy)Nukleinsäure
bp		: Basenpaare einer Nukleinsäure
Background		: unspezifischer Hintergrund
cpm		: Zählimpulse pro Minute (counts per minute)
cDNA		: komplementäre DNA
CTL		: cytotoxischer T-Lymphozyt
D		: Dalton
DNA		: Desoxyribonukleinsäure
	ds	: doppelsträngig
	ss	: einzelsträngig (single strand)
FAD		: Frequenz des Antigens in der Patientengruppe
FAP		: Frequenz des Antigens in der Normalpopulation
FCS		: fötales Kälberserum
H-2		: Histokompatibilitätskomplex der Maus
HLA		: Histokompatibilitätskomplex des Menschen
IEF		: Isoelektrische Fokussierung
IEP		: Isoelektrischer Punkt
Ig		: Immunglobuline
IP		: Immunpräzipitation
M		: Molarität
MG		: relatives Molekulargewicht
MHC		: Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
min		: Minuten
MLC		: mixed lymphocyte culture
OD		: optische Dichte
PAGE		: Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS		: phosphate buffered saline
Präfixe	d	: desoxy
	k	: kilo (10^3)
	m	: milli (10^{-3})
	u	: mikro (10^{-6})
RNA		: Ribonukleinsäure
	mRNA	: messenger RNA
	rRNA	: ribosomale RNA
	tRNA	: transfer RNA
rpm		: Umdrehungen (Rotationen) pro Minute
RR		: relatives Risiko
SDS		: Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
% w/w, w/v, v/v		: Prozentangaben - weight/weight, weight/volume, volume/volume
U		: enzymatische Einheit (unit)

Bezeichnungen der 2'-Desoxynukleotid-5'-Triphoshate der DNA:

A, C, G, T	: Basenbezeichnung der dNTP bei Sequenzangaben
dA, dC, dG, dT	: hauptsächlich verwendete Angabe bei Oligomeren
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	: bei Lösungen angewandte Bezeichnung der dNTPs (vorliegende Form meist als Natriumsalze)
dNTP	: 2'-Desoxynukleotid-5'-Triphospahat (N steht für eine der 4 Basen)

D A N K S A G U N G E N

Herrn Prof. T. Meo, Institut Pasteur, Paris

danke ich für die Überlassung dieses interessanten Themas und das Vertrauen, welches er mir und meiner Arbeit entgegenbrachte. Durch kritische und wertvolle Diskussionen, wenngleich aufgrund der Umstände und Entfernung leider etwas selten, habe ich viel lernen können und dafür bin ich ihm sehr verpflichtet.

Herrn Prof. G. Riethmüller

möchte ich für die Arbeitsmöglichkeit am Institut für Immunologie und die Unterstützung einer Zusammenarbeit über Landesgrenzen hinweg herzlich danken.

Herrn Prof. H. Cleve

danke ich für die Vertretung dieser Arbeit vor der biologischen Fakultät.

Frau Dr. E. Weiß

möchte ich für die ermöglichte Fortführung der vorliegender Arbeit in dem von ihr übernommenen Labor danken.

Allen Mitgliegern

des Labors und des Instituts für Immunologie gilt mein besonderer Dank für angetroffene Kollegialitat und Hilfsbereitschaft. Namentlich danken möchte ich C. Dörner, M. Lang, A. Hahn, J. Johnson, G. Wildner und U. Bichert.

Die für die vorliegende Arbeit benötigten Sachmittel wurden größtenteils durch den SFB 37 (Projekt 9) und SFB 217 (Projekt A1) zur Verfügung gestellt.

L E B E N S L A U F

Name	: Hannelore Szöts
wohnhaft in	: Bahnhofstr. 28 D - 8082 Grafrath
17.06.1954	: geboren in Kronstadt (Brasov) / Rumänien
1961 - 1969	: Allgemeine Schule in Kronstadt
1969	: Zulassungsprüfung für das Lyzeum
1969	: Start dieser Aufbauschule in Kronstadt
Dez. 1969	: Emigration mit der Familie von Kronstadt nach München
1969 - 1974	: Fortsetzung des Gymnasiums in München
Mai 1974	: Abitur
1974 - 1980	: Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München mit den Schwerpunkten: Humangenetik, Biochemie und Mikrobiologie
1981	: Diplomarbeit: "Untersuchung zellfrei synthetisierter Produkte der mRNA aus humanen Melanomzellen mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern" Betreuer: Dr. T. Meo Ort der Durchführung: Institut für Immunologie der LMU in München
April 1982	: Beginn der Doktorarbeit Betreuer: Dr. T. Meo, Institut Pasteur, Paris Ort der Durchführung: Institut für Immunologie der LMU in München